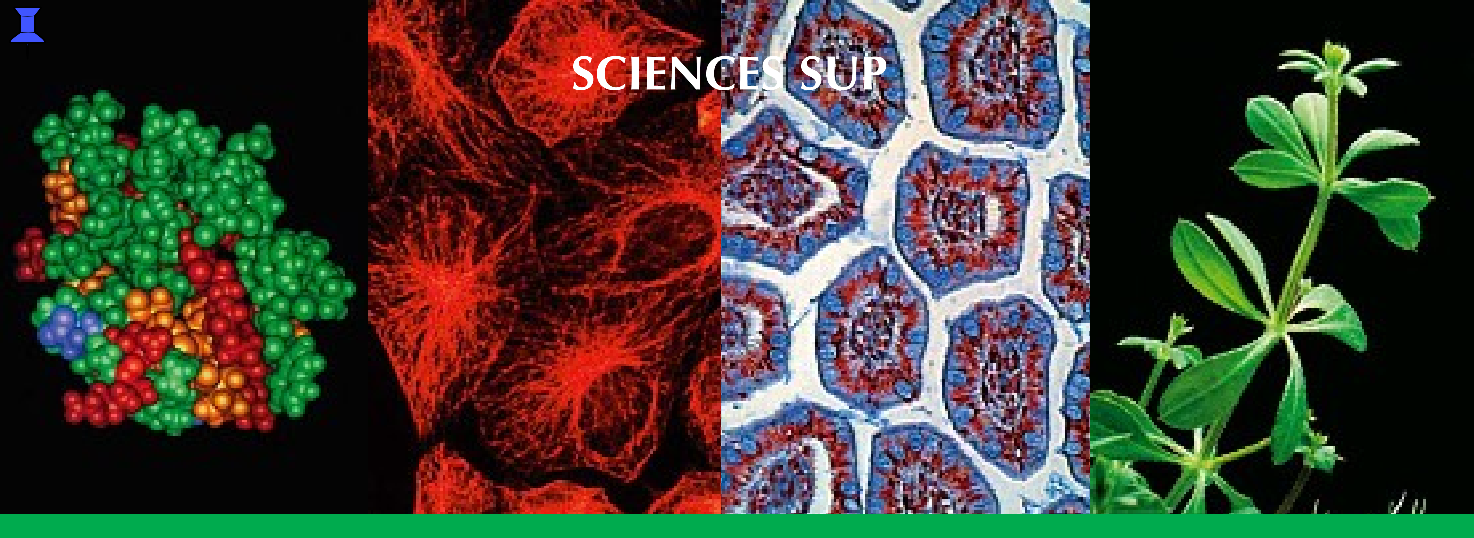


Cours, questions de révision et QROC

Licence SV • PCEM • PCEP • Classes préparatoires

BIOLOGIE CELLULAIRE

Des molécules aux organismes

2e édition



Jean-Claude Callen

Avec la collaboration de Roland Perasso



CHEZ LE MÊME ÉDITEUR

QCM de biologie cellulaire, J.-C. CALLEN, R. CHARRET, J.-C. CLÉROT, 2004.
Atlas de biologie cellulaire, J.-C. ROLAND, J.-C. CALLEN, A. et D. SZÖLLÖSI, 5e édition, 2001.

Vous pouvez consulter l'ensemble de notre catalogue sur notre site internet
http://www.dunod.com

« Ouvrage traduit en espagnol : *Biología celular ; de las moleculas a los organismos* ;
CECSA, Mexico, 2000 »

Les illustrations de l'ouvrage ont été réalisées
par Frédéric Massie

Illustration de couverture, de gauche à droite :
modèle compact de protéine (collection Labo-BG, Orsay) ; cellules animales en culture marquées par un anticorps anti-tubuline (cliché Marie-Hélène Bré, Labo-BC4, Orsay) ; coupe d'iléon de chat (cliché Ghislaine Fryd-Versavel, Labo-BC4, Orsay) ; jeune tige de Rubiacée (collection Labo-BG, Orsay).

ISBN 2 10 049236 5

PRÉFACE À LA SECONDE ÉDITION

L'extraordinaire diversité du monde vivant est pour beaucoup d'entre nous un sujet d'étonnement et d'émerveillement. Et pourtant, tous les organismes qui composent cette biodiversité fonctionnent sur la base de mécanismes vitaux qui révèlent de nombreuses similitudes. Ce paradoxe apparent tient au fait que chaque organisme est constitué de cellules, unités élémentaires du vivant, qui dérivent toutes d'une forme cellulaire ancestrale commune. Les cellules animales, comme les cellules végétales, les protistes ou encore les bactéries, ont hérité des mêmes grands mécanismes fonctionnels. C'est la raison pour laquelle la Biologie Cellulaire constitue le fondement de tout enseignement de Biologie, quelle que soit la finalité de cet enseignement : recherche, éducation, médecine ou pharmacie.

La nouvelle édition du livre de Jean-Claude Callen constitue une remarquable synthèse des notions modernes de Biologie Cellulaire que les étudiants entrant à l'Université ou en classes préparatoires se doivent d'acquérir. Cette nouvelle édition était une nécessité car elle devait s'enrichir des progrès de la recherche menée au cours de ces dernières années. Le décryptage de génome de nombreux organismes associés au développement des techniques de Biologie Moléculaire, et l'émergence de nouvelles technologies performantes dans le domaine de l'imagerie, ont été des facteurs décisifs dans l'avancée des connaissances en Biologie Cellulaire.

Certes, tous les mécanismes cellulaires et leurs réseaux de régulation sont loin d'être élucidés. Toutefois, le niveau de connaissance atteint aujourd'hui permet déjà de comprendre bon nombre de pathologies humaines ou animales, associées à des dérèglements cellulaires précis, ouvrant de ce fait de nouvelles perspectives thérapeutiques et de prévention. Jean-Claude Callen a eu le souci constant de rappeler, sous forme d'encarts, les relations étroites qui existent entre la Biologie Cellulaire et la pratique médicale. Cette illustration de l'impact croissant de la Biologie Cellulaire et Moléculaire sur la santé humaine est d'un intérêt majeur pour les étudiants en médecine, et ne peut que les stimuler dans l'apprentissage de leur art.

En tant que Professeur de Biologie, responsable du PCEM1 d'un grand CHU Parisien, je connais les nombreuses difficultés rencontrées par les étudiants pour leur préparation au concours. Parmi celles-ci, l'une est le niveau de connaissance requis pour espérer être classé en rang utile. Une autre, plus subtile, concerne l'aptitude de l'étudiant à s'autoévaluer. La seconde édition de « Biologie Cellulaire » de Jean-Claude Callen répond à ces deux aspirations. Son contenu, actualisé et condensé, est parfaitement adapté au niveau d'apprentissage nécessaire pour se présenter aux épreuves du concours. De plus, une autoévaluation est proposée sous forme de plus de 300 questions de type QROC (Questions à Réponses Ouvertes et Courtes), similaires à celles que nous posons lors de nos véritables épreuves. L'étudiant aura donc la possibilité de tester à la fois ses connaissances et son esprit d'analyse, mais aussi son aptitude à répondre à ces questions durant un temps limité.

Le livre de Jean-Claude Callen possède bien d'autres qualités que le lecteur découvrira et appréciera, en particulier une illustration abondante avec des schémas d'une grande clarté et d'une grande précision. C'est un livre agréable à lire dont je recommande vivement la lecture à tous les étudiants, particulièrement à ceux qui préparent des concours. Ce livre apportera de nombreuses réponses à leurs questions, il les fera réfléchir, et cette réflexion génèrera, je l'espère, de nouvelles et pertinentes interrogations.

Roland Perasso
Professeur à l'Université Paris Sud XI
Directeur du laboratoire de Biologie Cellulaire 4, UMR CNRS 8080

PRÉFACE À LA PREMIÈRE ÉDITION

La vie est en nous, dans les êtres vivants qui nous entourent et qui ont contribué au façonnage de la Terre au cours de milliards d'années.

Notre santé, notre alimentation, les progrès de nos sociétés dépendent de notre connaissance et de notre compréhension du vivant. Chaque génération a apporté sa contribution à la construction de ce savoir. La structure logique de celui-ci a été établie au cours de ce siècle par la théorie cellulaire. Elle énonçait que la cellule est l'unité de structure et de fonction du monde vivant et que toute cellule dérive d'une cellule préexistante. La biologie cellulaire était ainsi née. Elle allait, par la suite, trouver sa place de manière cartésienne dans les enseignements fondamentaux de la formation supérieure des biologistes, puis, plus généralement, dans celle de tous les lycéens.

Comme pour toutes les disciplines scientifiques, l'émergence de nouveaux outils produit des avancées conceptuelles et technologiques qui mettent à l'épreuve les connaissances existant à un moment donné. À ce titre, au milieu de ce siècle, la microscopie électronique a constitué pour la biologie cellulaire un saut capital. Elle a tout à la fois validé le fondement de la théorie cellulaire et dévoilé par la découverte intime des membranes et des organites une richesse, une complexité et une cohérence extraordinaires. La biologie cellulaire s'est imposée alors comme élément central de la connaissance du vivant car elle tisse les liens entre des niveaux d'organisation différents, moléculaires, organismiques et populationnels (à travers la reproduction). Elle ouvre parallèlement des voies d'étude pour mieux comprendre la diversité et l'unicité du vivant. La biochimie, la génétique, la biophysique, la physiologie, la biologie moléculaire vont tour à tour en développer et en éclairer des aspects essentiels : le métabolisme, l'ADN et les génomes, les membranes et leurs remarquables propriétés de surface et d'échange, la photosynthèse, la synthèse protéique, etc.

Appuyées sur la biologie cellulaire, toutes les disciplines biologiques, y compris les plus éloignées a priori comme l'écologie ou l'évolution, connaissent aujourd'hui un essor extraordinaire qui fonde des progrès biotechnologiques et des transformations économiques considérables. Ce mouvement est loin d'être épuisé, car les milliers ou dizaines de milliers de gènes qui font un génome, et l'infinie variation des médiations environnementales constituent autant de possibilités de vivre et de réagir pour les cellules, qui ne seront pas toutes explorées dans un avenir prévisible. En revanche, les jeunes générations de scientifiques et de citoyens auront à s'en préoccuper pour comprendre le milieu où elles vivent et sur lequel elles agissent.

L'enseignement de la biologie cellulaire reste donc aujourd'hui tout aussi indispensable qu'il l'était il y a dix ou vingt ans, mais il se doit de changer de pratique.

Certes, la magie de la découverte de la cellule et de sa complexité doit toujours être communiquée aux étudiants. Mais l'exigence intellectuelle et sociale va au-delà. Cet enseignement doit préparer les jeunes scientifiques à l'approche et à la compréhension de la complexité et de la cohérence cellulaires. Comme la discipline a dépassé le stade où elle peut être présentée de façon exhaustive, un nouvel exercice pédagogique qui incite à la curiosité et à l'effort d'imagination, qui fournisse les fondements de la connaissance les plus pertinents et les démarches de raisonnement, est maintenant nécessaire. Certes des livres spécialisés et très complets, principalement anglo-saxons, existent bien mais ils s'adressent le plus souvent à un public déjà initié. Nous avions besoin d'un ouvrage qui ait les qualités évoquées plus haut, tout en s'adressant à un public de jeunes bacheliers. Je suis convaincu que Jean-Claude Callen a produit cet ouvrage. Il sait apporter des connaissances, couvrir l'ensemble du domaine et susciter la curiosité sans jamais la saturer par une inutile exhaustivité. Il en appelle à notre esprit et à notre sens esthétique par la qualité de la présentation et celle des illustrations et des figures. Il nous interroge discrètement sur ce que nous avons retenu. Il nous présente un texte vivant où les maîtres de la discipline sont évoqués pour la qualité de leurs apports et où l'histoire a sa place. Enfin, il nous rappelle avec délicatesse que la biologie cellulaire est une véritable discipline et que le dogme doit s'effacer avec humilité devant l'expérience et la critique.

Je souhaite que de nombreux jeunes lecteurs (et de moins jeunes) prennent un grand plaisir à lire ce livre, tout en en faisant un outil qui les accompagne dans leur étude et la construction de leur représentation de la vie.

Jean-Claude Mounolou
Professeur honoraire à l'université Paris-Sud (Centre d'Orsay)

TABLE DES MATIÈRES

Préface à la seconde édition
Préface à la première édition
Liste des textes biomédicaux
Avant-propos
Remerciements

Chapitre 1. La logique moléculaire du vivant 1

1. Caractéristiques identifiant le monde vivant 2
2. Des molécules aux organismes 6
3. Transformations de matière et d'énergie dans le monde vivant 13
4. Objectifs et place de la biologie cellulaire dans l'ensemble de la biologie 17

Résumé 21
QROC 22

Chapitre 2. Organisation cellulaire 23

1. Historique de la notion de cellule 23
2. Outils et techniques d'observation des cellules 25
3. Plans d'organisation cellulaire 33

Résumé 45
QROC 46

Chapitre 3. Analyse des constituants et du fonctionnement des cellules 47

1. Méthodes d'analyse des constituants cellulaires 48
2. Outils et techniques d'analyse du fonctionnement cellulaire 61

Résumé 71
QROC 72

Chapitre 4. Flux de l'information génétique 73

1. Identification de la nature chimique du matériel héréditaire 74
2. Principes de l'expression du matériel génétique. Le dogme fondamental 78
3. Mécanismes moléculaires et produits de la transcription des gènes 82
4. Organisation des gènes de protéines chez les Procaryotes et les Eucaryotes 87
5. Expression des gènes chez les Procaryotes 89
6. Mécanismes moléculaires de la traduction 93
7. Organisation et taille des génomes chez les Virus et les Êtres vivants 100

Résumé 107
QROC 109
Perspective biomédicale 108

Chapitre 5. Organisation générale et fonctions des membranes biologiques 110

1. Composition chimique des membranes 111
2. Organisation moléculaire des membranes 116
3. Propriétés générales des membranes 126
4. Diversité des fonctions membranaires au sein des cellules 132

Perspective biomédicale 136
Résumé 137
QROC 138

Chapitre 6. Échanges de matière entre cellule et milieu extérieur 139

1. Organisation et propriétés générales de la membrane cytoplasmique 139
2. Perméabilité membranaire. Transporteurs membranaires 141
3. Transport membranaire des macromolécules et des particules chez les Eucaryotes 158

Perspective biomédicale 167
Résumé 168
QROC 169

Chapitre 7. Nutrition et croissance des cellules 170

1. Utilisation des nutriments pour la croissance cellulaire 171
2. Accumulation et dégradation des réserves chez les Procaryotes et les Eucaryotes 176
3. Les lysosomes des cellules animales, des Protistes et des Champignons 184
4. Les vacuoles des cellules végétales 194

Perspective biomédicale 200
Résumé 201
QROC 202

Chapitre 8. Expression des gènes nucléaires chez les eucaryotes 203

1. Organisation du matériel génétique chez les Eucaryotes 203
2. Rôle du noyau dans la vie cellulaire 209
3. Les chromosomes géants et leur activité 214
4. Caractères spécifiques de la transcription chez les Eucaryotes 219
5. Transcription des gènes codant les protéines (ARNm) 225
6. Transcription des gènes codant les ARNr. Édification des ribosomes au sein du nucléole 230
7. Éléments de contrôle de l'expression des gènes chez les Eucaryotes 233

Perspective biomédicale 242
Résumé 243
QROC 244

Chapitre 9. Synthèse et routage des protéines chez les eucaryotes. Biogenèse des organites 245

1. Problématique : le concept de routage 245
2. Rôle du réticulum endoplasmique dans la synthèse des protéines 248
3. Rôle de l'appareil de Golgi dans la maturation des protéines et la synthèse des polysaccharides 263
4. Rôle de l'appareil de Golgi dans le tri des protéines 273
5. Routage des protéines vers le noyau, les organites semi-autonomes et les peroxysomes 278
6. Panorama général du trafic membranaire et protéique intracellulaire 286

Perspective biomédicale 288
Résumé 289
QROC 290

Chapitre 10. Conversion de l'énergie : mitochondries et chloroplastes 291

1. Morphologie et ultrastructure des mitochondries et des plastes 291
2. Rôle des mitochondries dans la respiration cellulaire 298
3. Rôle des chloroplastes dans la photosynthèse 305
4. Autres fonctions des mitochondries et des plastes. Intégration du métabolisme énergétique et intermédiaire 317
5. Les peroxysomes : des organites à fonction oxydative non générateurs d'énergie 322

Perspective biomédicale 325
Résumé 326
QROC 327

Chapitre 11. Architecture et motilité cellulaires 328

1. Structures cytosquelettiques des cellules eucaryotiques 328
2. Constitution chimique et organisation moléculaire des éléments du cytosquelette 334

3. Fonctions du cytosquelette et des structures associées 340
4. Motilité des cellules procaryotiques 355
Perspective biomédicale 359
Résumé 360
QROC 361

Chapitre 12. Prolifération des cellules. Aspects moléculaires et cellulaires de la division 362

1. Les divisions cellulaires dans le monde vivant 363
2. Mécanismes moléculaires de la duplication du matériel génétique 365
3. Mécanismes de réparation de l'ADN 376
4. La mitose chez les cellules animales et végétales 377
5. Les caryotypes et leur utilisation 389
Perspective biomédicale 393
Résumé 394
QROC 395

Chapitre 13. Contrôle du cycle cellulaire chez les Eucaryotes 396

1. Le cycle cellulaire et ses méthodes d'analyse chez les Eucaryotes 397
2. Contrôle de la prolifération des cellules chez les organismes pluricellulaires 404
3. Mécanismes moléculaires de la signalisation cellulaire 406
4. Dérégulations du cycle cellulaire : apoptose et cancer 409
Perspective biomédicale 413
Résumé 414
QROC 415

Chapitre 14. De la cellule à l'organisme. La différenciation cellulaire 416

1. Notion de différenciation cellulaire 416
2. Relations directes entre les cellules au sein de l'organisme 423
3. L'environnement immédiat des cellules : les matrices extracellulaires 432
4. Diversité des fonctions des matrices extracellulaires 440
5. Communication à distance entre cellules au sein de l'organisme 443
Perspective biomédicale 445
Résumé 446
QROC 447

Chapitre 15. Aux confins du monde vivant : viroïdes, plasmides et virus 448

1. Viroïdes et plasmides 448
2. Virus 451
3. Virus et plasmides comme modèles d'étude et outils en biologie 466
4. Les prions : des agents infectieux non conventionnels 469
Perspective biomédicale 471
Résumé 472
QROC 473

Chapitre 16. L'origine de la vie. L'apparition des différents types cellulaires 474

1. Histoire de la vie sur la Terre 474
2. Période prébiotique 475
3. Des protocellules à la cellule ancestrale 481
4. Apparition des cellules eucaryotiques ; origine des organites 482
5. Conclusion : l'arbre universel du monde vivant 487
Résumé 490
QROC 491

Bibliographie 492
Index 493

LISTE DES TEXTES BIOMÉDICAUX

Encart biomédical. L'alcaptonurie, première maladie génétique humaine identifiée 76
Encart biomédical. Antibiotique et synthèse protéïque 98
Perspective biomédicale. Résistance des bactéries aux antibiotiques et santé publique 108

Chapitre 5

Perspective biomédicale. L'utilisation thérapeutique des liposomes 136

Chapitre 6

Encart biomédical. Les hypercholestérolémies familiales 163
Encart biomédical. Sécrétion de l'histamine et réaction inflammatoire 165
Perspective biomédicale. La mucoviscidose 167

Chapitre 7

Encart biomédical. Les vitamines et autres nutriments essentiels 171
Encart biomédical. Exemples de maladies lysosomales non génétiques : silicose et goutte 193
Perspective biomédicale. Les diabètes sucrés 200

Chapitre 8

Encart biomédical. Le lupus érythémateux systémique 214
Encart biomédical. Les hémoglobines : anémies falciformes et thalassémies 229
Perspective biomédicale. Les thérapies géniques 242

Chapitre 9

Encart biomédical. Nanisme et gigantisme : des disfonctionnements de l'hypophyse 268
Perspective biomédicale. Les maladies génétiques lysosomales 288

Chapitre 10

Encart biomédical. Sport, métabolisme oxydatif et aide ergogénique à la performance 305
Perspective biomédicale. Les maladies mitochondriales 325

Chapitre 11

Encart biomédical. Les substances antimitotiques 336
Encart biomédical. Les maladies génétiques du cytosquelette 346
Perspective biomédicale. La myopathie de Duchenne 359

Chapitre 12

Encart biomédical. Les anomalies chromosomiques chez l'Homme 391
Perspective biomédicale. Les maladies de la réparation de l'ADN 393

Chapitre 13

Encart biomédical. Dysfonctionnements hormonaux et récepteurs membranaires 407
Encart biomédical. Les gènes de prédisposition au cancer 412
Perspective biomédicale. Cellules souches et thérapie cellulaire 413

Chapitre 14

Encart biomédical. Les maladies génétiques des jonctions intercellulaires ou de liaison à la matrice extracellulaire 426
Encart biomédical. Adhérence cellulaire et métastases 431
Perspective biomédicale. Les maladies du collagène et de la matrice extracellulaire 445

Chapitre 15

Encart biomédical. Les causes de la variabilité des virus de la grippe du groupe A 456
Encart biomédical. Virus VIH et SIDA 465
Encart biomédical. L'affaire des vaches folles et la transmission des prions à l'Homme 469
Perspective biomédicale. Les infections virales émergentes 471

AVANT-PROPOS

Ce manuel s'adresse principalement aux étudiants en biologie des premiers cycles universitaires : DEUG SV, classes préparatoires aux grandes écoles, facultés de médecine et pharmacie, etc. Il est également destiné aux candidats aux concours de recrutement des Professeurs du second degré qui y trouveront, sous une forme condensée, les données de base les plus récentes relatives au fonctionnement des cellules.

Au cours de leurs années de lycée, les étudiants ont acquis une vaste culture générale en biologie, fondée sur une approche essentiellement organismique. L'inconvénient d'une telle démarche, aux yeux des «cellularistes», est que les bases cellulaires des phénomènes vitaux y apparaissent éclatées à la fois dans l'espace (au sein d'un même ouvrage) et dans le temps (tout au long du cursus scolaire). Les cellules ne sont alors perçues que comme des éléments de structure et de fonction au service d'un ensemble d'ordre supérieur, et non comme des entités ayant une autonomie, une vie propre. Outre l'approfondissement indispensable des connaissances conceptuelles et expérimentales, l'objectif majeur du présent ouvrage est de recentrer les préoccupations biologiques autour de la seule cellule, unité de base du monde vivant. En d'autres termes, il s'agit ici de faire vivre concrètement les cellules, de la même manière que l'on voit vivre les organismes macroscopiques qui nous entourent : en effet, comme eux, elles se nourrissent et grandissent, communiquent entre elles, se déplacent, se multiplient et meurent.

Bien que les contours de la discipline ne soient pas toujours faciles à cerner, ce manuel se veut être un ouvrage de stricte biologie cellulaire. En dehors de quelques brefs rappels, on n'y trouvera donc pas de données de biochimie : structure et propriétés des biomolécules, enzymologie, bioénergétique, métabolisme, etc., qui sont développées dans un ouvrage de la même collection (*Biochimie*, de Georges Hennen). Il faut bien insister sur le fait que de bonnes connaissances dans cette discipline sont indispensables pour comprendre les règles de construction des édifices constituant les cellules, ainsi que les multiples réactions chimiques qui s'y déroulent ; on rappelle en particulier l'importance capitale des interactions de surface entre macromolécules, que permet l'organisation tridimensionnelle unique des polymères biologiques. De même, les données de biologie moléculaire décrites dans cet ouvrage sont réduites au minimum nécessaire pour une bonne maîtrise des mécanismes conduisant à la synthèse et à la distribution intracellulaire des protéines, qui représentent l'activité majeure des cellules, et à la division du matériel génétique. En revanche, toutes les fonctions cellulaires liées à des structures ou des organites spécifiques, que ce soit chez les Procaryotes ou les Eucaryotes, constituent le corps de l'ouvrage et font l'objet de développements détaillés.

La première des idées-force que l'on souhaiterait faire passer à travers les divers chapitres de ce cours est que le fonctionnement des cellules est hautement intégré. Chez les Eucaryotes, en particulier, les principales fonctions vitales ne peuvent s'accomplir qu'en faisant intervenir un grand nombre de compartiments distincts ; de plus, une structure ou un organite bien précis participe le plus souvent à plusieurs activités différentes au sein des cellules. La deuxième idée est qu'il faut, à tous les niveaux, depuis les molécules jusqu'aux cellules, en passant par leurs structures élémentaires et les organites les plus variés, rechercher les rapports qui existent entre les structures et les fonctions : c'est la seule grille de lecture permettant de comprendre de manière définitive les mécanismes du vivant. À l'opposé de la représentation statique des cellules fournie par les micrographies, qui était celle répandue dans les années 60 à la suite du développement de la cytologie électronique, la vision actuelle des processus biologiques est essentiellement dynamique. Ces derniers se manifestent par une déformation incessante des membranes cellulaires, des déplacements d'organites sur de longues distances, des trafics en tous sens de molécules au sein du cytoplasme, des échanges d'information entre les cellules et leur milieu, etc.

Les données présentées dans ce livre s'appuient, autant que possible, sur des bases expérimentales ; les techniques utilisées de façon courante en biologie cellulaire y sont donc décrites en détail et abondamment illustrées. La tentation est toujours grande de proposer au lecteur les expériences les plus récentes dans la discipline. Cependant, leur complexité et leur haut degré de technicité conduisent souvent, après la nécessaire simplification inhérente au niveau auquel se situe cet ouvrage, à les rendre faussement intelligibles, voire parfaitement inintelligibles pour des non-spécialistes ; une telle approche superficielle tend de plus à faire croire que les données expérimentales sont faciles à obtenir et, par conséquent, définitives. C'est dans cet esprit que des méthodes et des expériences anciennes ont aussi été décrites ; outre leur intérêt historique, elles sont en général de construction plus simple et peuvent être présentées avec tous les contrôles et les témoins indispensables. Elles sont plus faciles à analyser, à critiquer et à comprendre complètement, que des protocoles modernes sophistiqués ; elles illustrent donc mieux la démarche expérimentale et s'avèrent bien plus démonstratives et formatrices pour le raisonnement scientifique.

La tendance actuelle, reflétée par les titres de plusieurs ouvrages de biologie cellulaire modernes, est d'accréditer l'idée réductrice selon laquelle il existerait une cellule-type et une grande uniformité des phénomènes biologiques à l'échelle cellulaire. N'a-t-on pas longtemps confondu, de cette façon, *Escherichia coli* avec l'ensemble des Procaryotes ? S'il est vrai que les biologistes moléculaires nous apprennent que les mécanismes génétiques fondamentaux unifient le monde vivant, il faut bien constater aussi l'extrême diversité morphologique et physiologique des catégories de cellules bactériennes, animales, végétales, etc., qu'il nous est donné d'observer. À la manière des humains, elles sont donc à la fois « toutes semblables et toutes différentes », et c'est ce qui fait sans doute la richesse et l'intérêt de la biologie cellulaire.

Rédiger seul un manuel couvrant une discipline aussi large, dont l'évolution est en outre très rapide, n'est pas sans risques ; nos étudiants méritent bien néanmoins que l'on en prenne quelques-uns. Les spécialistes pourront critiquer les simplifications inhérentes à ce genre d'ouvrage, discuter le choix des exemples et des illustrations, relever les éventuels oublis et erreurs qui ont pu se glisser dans le texte, malgré le soin apporté à sa rédaction et les précautions dont j'ai souhaité m'entourer. Je les prie simplement d'excuser ces imperfections et de bien vouloir me les faire connaître, afin que tous les lecteurs intéressés par l'étude du vivant disposent ultérieurement d'un texte aussi complet, fiable et attractif que possible.

J.-C. Callen
Laboratoire de Biologie Cellulaire 4 Orsay

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à Jean-Claude Mounolou, Professeur à l'université Paris-Sud, qui a eu la lourde tâche de lire la totalité de mon manuscrit ; ses commentaires avisés et ses critiques constructives m'ont été d'une grande aide dans la progression de ce travail. Je souhaite également remercier les nombreux enseignants-chercheurs qui ont accepté de revoir et corriger la plupart des chapitres de cet ouvrage :

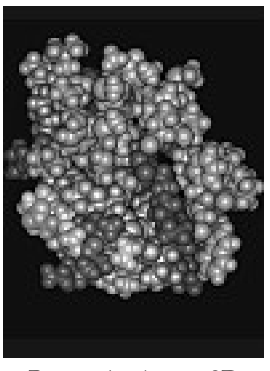
– Jacques Hourdry et Bernard Rossignol (Professeurs à l'université Paris-Sud), et Jean-Claude Clérot (Maître de conférences à l'université Paris-Sud) ont relu les chapitres 1, 2 et 3.
– Marguerite Picard (Professeur à l'université Paris-Sud) a relu les chapitres 4 et 8.
– Daniel Gros (Professeur à l'université d'Aix-Marseille II), Catherine Berrier et Michel Lemullois (Maîtres de conférences à l'université Paris-Sud) ont relu les chapitres 5 et 6.
– Jacques Hourdry, ainsi que Christian Bock, Daniel Codron et Jean-Pierre Muller (Maîtres de conférences à l'université Paris-Sud) ont relu le chapitre 7.
– Bernard Rossignol a relu le chapitre 9.
– Guy Dubertret (Maître de conférences à l'université Paris-Sud) a relu le chapitre 10.
– Sylvie Souès (Maître de conférences à l'université Paris-V) a relu les chapitres 12 et 13.
– Jean Génermont (Professeur à l'université Paris-Sud) a relu le chapitre 14.
– Jean-Michel Rossignol (Professeur à l'université Paris-Sud) a relu le chapitre 15.
– Hervé Le Guyader (Professeur à l'université Paris-Sud) a relu le chapitre 16.
– ainsi que Jean-Jacques Curgy (Professeur à l'université des sciences et technologies de Lille), Bernard Ducommun (Professeur à l'université Paul Sabatier à Toulouse) et Michel Mercier (Professeur à l'université Bordeaux I) qui ont été consultés lors de l'élaboration du projet.

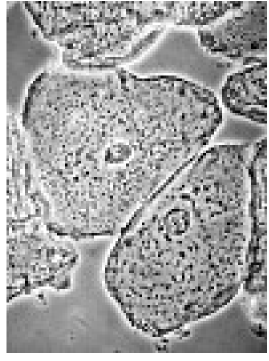
De très nombreuses photographies illustrant ce manuel m'ont été fournies par mes collègues du Centre d'Orsay ; je les en remercie sincèrement, et, en particulier, ceux du Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, dans les archives duquel j'ai abondamment puisé. J'adresse mes vifs remerciements à Anne Bourguignon et Joëlle Declercq qui ont suscité et supervisé avec efficacité, sans se départir de leur bonne humeur, la réalisation de la première édition de ce livre.

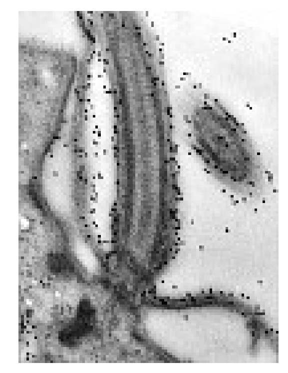
Je sais enfin gré à Roland Perasso, Professeur de Biologie Cellulaire au PCEM de l'Université Paris-Sud (le Kremlin-Bicêtre) d'avoir accepté de lire et corriger l'ensemble des textes biomédicaux qui enrichissent la deuxième édition de cet ouvrage.

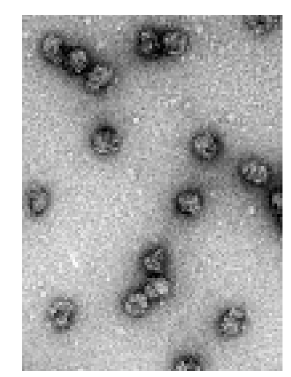
Après avoir dédié la première édition de cet ouvrage à la mémoire de Françoise Mignotte, qui aimait passionnément la vie, et n'a pas été payée en retour, mes pensées vont, à l'occasion de la parution de cette deuxième édition, vers Georges Prévost (1927-1970), Professeur de Biologie Générale à la Faculté des Sciences d'Orsay, trop tôt disparu, et grâce à qui j'ai eu la possibilité d'embrasser la passionnante profession d'Enseignant-Chercheur.

J.-C. Callen

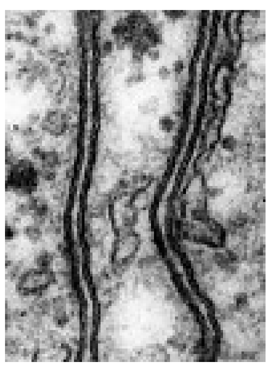

Reconstitution en 3D d'une protéine (modèle compact)

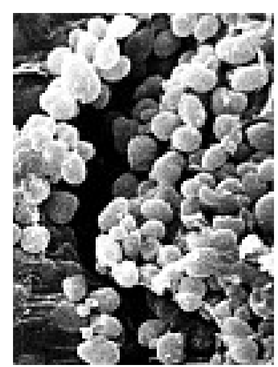

Cellules de l'épithélium buccal de l'Homme

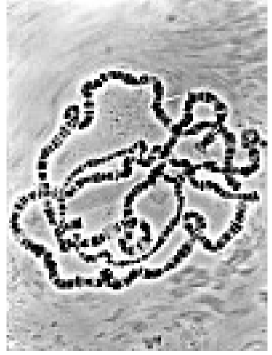

Détection immunocytochimique d'une protéine

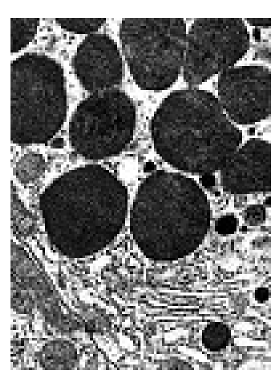

Ribosomes purifiés observés en coloration négative

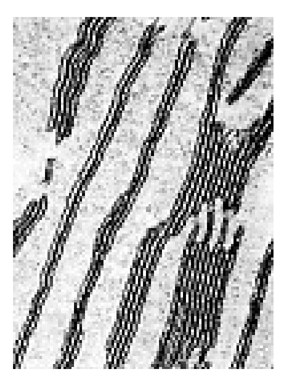

Bicouches artificielles observées après cryofracture

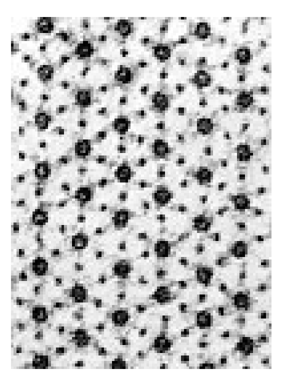

Membranes plasmiques de trois cellules voisines

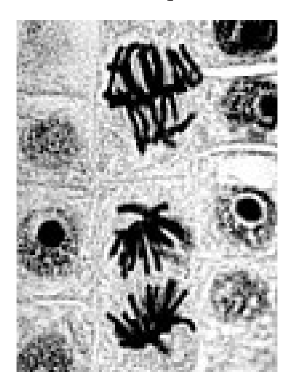

Grains d'amidon observés dans une cellule végétale

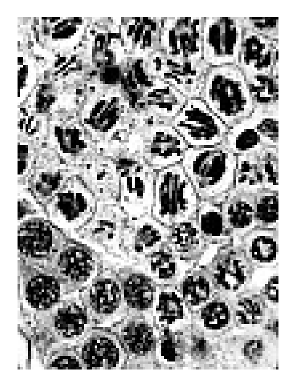

Chromosomes polyténiques de larve de Drosophile

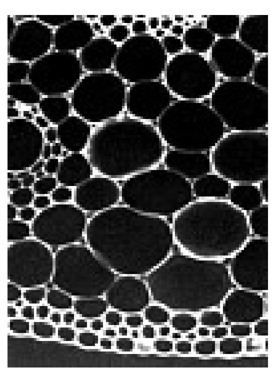

Granules de sécrétion dans une cellule de pancréas


Sacs thylakoïdiens et grana dans un chloroplaste

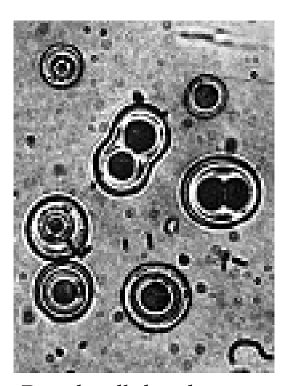

Structure d'une myofibrille en coupe transversale

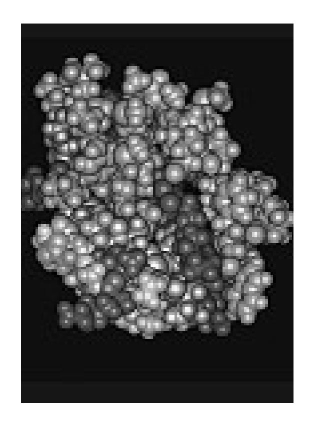

Figures de mitose et noyaux dans une racine d'ail


Cellules synchrones en méiose dans un testicule


Parois de cellules végétales dans une coupe de tige


Virus végétal filamenteux après ombrage métallique


Pseudocellules obtenues in vitro (microsphères)



Chapitre 1

LA LOGIQUE MOLÉCULAIRE DU VIVANT. DES MOLÉCULES AUX ORGANISMES

Bien que chacun de nous soit intuitivement capable de faire la différence entre un être vivant (un animal ou une plante), et un objet minéral (un caillou ou de l'eau), de nombreuses difficultés surgissent lorsqu'il s'agit de définir avec précision ce qu'est un être vivant et ce que représente ce phénomène que l'on appelle la vie. À l'évidence, les organismes vivants manifestent des propriétés extraordinaires que ne possède pas la matière inanimée : l'animal se déplace, la graine germe, alors que la roche gît, massive et sans réaction. Il existe visiblement, entre les deux catégories d'objets, des différences qui semblent fondamentales et irréductibles.

L'analyse chimique montre pourtant que l'on y trouve les mêmes atomes et que la matière vivante est constituée de molécules organiques inanimées obéissant aux lois physiques et chimiques qui régissent le comportement de toute matière dans l'univers. Les chimistes nous montrent cependant que la frontière entre le vivant et le non-vivant ne passe pas simplement entre le minéral et l'organique car, depuis plus de 150 ans, ils sont capables de fabriquer de toutes pièces des molécules d'une complexité équivalente à celle des molécules trouvées chez les êtres vivants. C'est au niveau de l'organisation macroscopique et microscopique de ces derniers que l'on trouve les premiers critères vraiment indiscutables d'une distinction fondamentale entre le monde vivant et les objets du milieu minéral : même les êtres vivants les plus simples sont extrêmement complexes si on les compare aux constructions cristallines les plus élaborées.

Un être n'est pas vivant du seul fait de la complexité et du nombre considérable de molécules différentes qui le constituent. Il n'est pas si facile, parfois, quel que soit le niveau d'organisation auquel on s'adresse, de distinguer la vie ralentie de l'absence de vie, la vie de la mort, et les êtres vivants illustrent par excellence le précepte selon lequel « le tout peut être bien plus que la somme des parties » ! Un organisme n'est vivant que si on peut lui attribuer un certain nombre de propriétés dynamiques rassemblées sous le terme de **physiologie**. Les caractéristiques fonctionnelles propres à la matière vivante sont les suivantes :

– accroissement et renouvellement permanent de sa substance, liés à une activité complexe de synthèse et de dégradation : le **métabolisme** ;

– capacité de réaction et **excitabilité**, que l'on peut détecter à tous les niveaux, depuis la molécule jusqu'à l'organisme ;

– **reproduction** conforme et, même si cela semble contradictoire, possibilité pour le matériel génétique, qui est le support physique de cette propriété, de changement et d'**évolution**.

C'est l'ensemble de ces processus, réunis chez tous les êtres vivants, et associés aux critères de structure signalés plus haut, qui fonde le « phénomène vie ». Celui-ci ne relève donc pas d'une force spéciale qui caractériserait la matière vivante, comme on le croyait encore à la fin du XIXe siècle (esprit vitaliste) ; et si l'on est tenté de considérer que les organismes vivants forment un monde à part, distinct du monde inanimé, il faut garder à l'esprit que tous les phénomènes qui se déroulent chez eux sont conformes aux lois générales de la physique et de la chimie. L'extrême complexité des molécules, des structures, des mécanismes mis en œuvre et des réseaux d'interactions existant chez les êtres vivants reste cependant l'objet des multiples questions sans réponses auxquelles sont confrontés les biologistes.

1. CARACTÉRISTIQUES IDENTIFIANT LE MONDE VIVANT

1.1. Composition chimique élémentaire de la matière vivante

Bien que n'apportant pas de renseignements directement utiles aux biologistes, la comparaison de la composition atomique de la matière vivante actuelle avec celle des éléments de la biosphère (la croûte terrestre : atmosphère + hydrosphère + lithosphère) est intéressante ; elle souligne en effet les caractères originaux de la constitution chimique du monde vivant. L'analyse des atomes constitutifs de divers êtres vivants, comparée à celle du monde minéral (voir *tableau* 1.1), permet de tirer les conclusions suivantes :

– tous les atomes constitutifs des êtres vivants se rencontrent aussi dans la croûte, ce qui semble logique dans la mesure où la vie a pris naissance à la surface de la Terre, bien que les choses soient plus compliquées (voir chapitre 15). Il y a cependant peu de ressemblances entre les deux listes, classées par ordre décroissant d'abondance ;

– seuls 20 à 25 éléments sont recensés chez les êtres vivants, la variation portant sur certains atomes rares non représentés dans toutes les espèces. On

Biosphère (%)			Cellules animales (%)		Cellules végétales (%)	
O	(8)	50,0	O	62,8	O	77,9
Si	(14)	25,8	C	19,4	C	11,3
Al	(13)	7,3	H	9,3	H	8,7
Fe	(26)	4,2	N	5,1	N	0,8
Ca	(20)	3,2	Ca	1,38	P	0,70
Na	(11)	2,3	S	0,64	Ca	0,58
K	(19)	2,3	P	0,63	K	0,22
Mg	(12)	2,1	Na	0,26	S	0,10
H	(1)	0,9	K	0,22	Mg	0,08
Ti	(22)	0,43	Cl	0,18	Cl	0,07
Cl	(17)	0,20	Mg	0,04	Na	0,03
C	(6)	0,18				
P	(15)	0,11	F	0,009	Si	0,0093
S	(16)	0,11	Fe	0,005	Fe	0,0027
F	(9)	0,10	Si	0,004	Al	0,0025
Ba	(56)	0,08	Zn*	0,002	B*	0,0007
Mn	(25)	0,08	Al	0,001	Mn	0,0003
N	(7)	0,03	Cu*	0,0004	Zn	0,0003
Se	(34)	0,02	Se	0,0002	Cu	0,0002
			Br*	0,0002	Ti	0,0001
divers		0,47	Mn	0,0001		
			I	0,0001	divers	0,0001
			divers	0,0002		

(–) : n° atomique (*) Zn (30), Cu (29), Br (35), B (5)

Tableau 1.1

Composition pondérale élémentaire comparée entre la biosphère et deux types d'organismes : animal (corps humain) et végétal (pied de luzerne)

Trois groupes d'atomes, respectivement abondants, peu abondants et rares peuvent être distingués chez les êtres vivants ; quatre éléments : C, H, O, N, rendent compte de plus de 96 % de la masse de ces derniers. L'abondance en O, significativement supérieure chez les Végétaux, tient au degré d'hydratation plus élevé en moyenne chez les cellules végétales, relativement aux cellules animales. (D'après G. Bertrand, 1951).

distingue trois groupes, selon leur importance : 4 atomes abondants, 7 atomes moyennement ou peu abondants, environ 15 atomes « traces », dont une dizaine sont universels et indispensables à la vie ; les deux premières catégories représentent à elles seules 99 % de la masse totale ;
- la matière vivante sélectionne de façon considérable certains éléments du milieu : N (170 fois), C (100 fois), H (10 fois), S et P (6 fois), de sorte que la composition chimique globale des êtres vivants est qualitativement différente de celle du monde minéral ;
- l'oxygène est l'élément le plus représenté dans les deux mondes, car il est un constituant de l'eau ; il est le plus lourd de ceux abondants chez les êtres vivants et le plus léger de ceux abondants dans la croûte terrestre ;
- en dehors de l'oxygène, le monde vivant est caractérisé par le carbone (monde des molécules organiques) alors que le monde minéral est caractérisé par le silicium (monde des silicates).

Il faut remarquer que les quatre éléments les plus abondants chez les êtres vivants : C, H, O, N, sont capables de réaliser des liaisons covalentes en mettant en œuvre : 1 électron (H), 2 électrons (O), 3 électrons (N) et 4 électrons (C) pour saturer leurs orbitales périphériques (à 2 ou 8 positions). Ces éléments sont les plus légers qui soient capables de réaliser des liaisons covalentes (les trois derniers pouvant réaliser des liaisons simples, doubles ou triples) ; avec ces quatre atomes, les êtres vivants élaborent une grande diversité de biomolécules, depuis des molécules simples et de petite taille jusqu'à des macromolécules ayant une organisation très sophistiquée.

Le carbone a ainsi un rôle central en chimie organique car il peut, étant situé à mi-chemin entre les atomes électropositifs et électronégatifs, se combiner aisément avec O ou N, aussi bien qu'avec H (on parle alors de forme réduite). De plus, il se lie à lui-même pour donner des chaînes linéaires ou ramifiées, des cycles ou des structures tridimensionnelles. L'unique forme minérale de C directement accessible aux êtres vivants est le CO_2 gazeux de l'atmosphère ou dissous dans l'eau, que seuls les Végétaux verts et quelques bactéries photosynthétiques sont capables d'extraire de la biosphère.

Outre ces atomes majeurs, deux autres, moins abondants, entrent aussi dans la constitution de certaines molécules organiques : S et P (dans les protéines et les acides nucléiques). Tous les autres éléments existent sous forme ionique, dissous dans les liquides intra- ou intercellulaires, où ils ont des fonctions capitales (cations : Na^+, K^+, Ca^{2+} ; anions : Cl^-, NO_3^-, PO_4^{3-}, etc.), sous forme de sels insolubles ou de complexes avec des macromolécules (en général des protéines).

1.2. Organisation macro- et microscopique

Les êtres vivants les plus accessibles à l'observation directe (dite macroscopique) sont caractérisés par une morphologie et une organisation générale très diverses et souvent complexes ; celles-ci ont servi depuis longtemps à classer les millions d'espèces vivantes et à poser les premiers jalons de la théorie de l'évolution. C'est aussi cette morphologie caractéristique qui permet aux paléontologues de reconnaître, par analogie, dans des formations entièrement minéralisées la présence d'organismes fossilisés et incorporés au monde inanimé ; s'accompagnant de symétries (par rapport à un axe ou un plan), elle constitue donc dans un premier temps un bon critère d'identification. Il peut y avoir cependant des difficultés avec certains cas particuliers d'êtres vivants contractant des liens étroits avec le milieu minéral (Lichens incrustants, par exemple) ou bien eux-mêmes fortement minéralisés (Algues calcaires). Cette diversité, qui frappe d'abord l'observateur, cache malgré tout une profonde unité de structure et de composition des êtres vivants.

C'est au niveau de l'organisation interne que cette complexité se manifeste le plus, et ce, jusqu'à l'échelle des cellules, qui représentent les plus petites unités de vie. L'utilisation du microscope et les techniques de la cytologie sont alors indispensables pour en réaliser l'analyse (voir chapitre 2) ; un organisme animal supérieur contient plus de 200 types cellulaires différents ! L'existence de structures emboîtées : organes, tissus, cellules, organites, édifices supramoléculaires, apparaissent fondamentalement caractéristiques du monde vivant et le différencient des constructions minérales simples que sont les cristaux. La variété et la complexité des roches que les géologues identifient dans le monde minéral sont moins grandes que celles des structures observées chez les organismes vivants, à tous les niveaux d'organisation. Des structures biologiques microscopiques ont été

exceptionnellement conservées de façon convenable dans des fossiles, au point qu'on peut dater l'apparition, au cours des temps géologiques, des premières cellules procaryotiques ou eucaryotiques (voir chapitre 16). L'organisation précise de ces cellules sera donnée dans le chapitre suivant.

1.3. Métabolisme

Les organismes vivants prélèvent leur matière (minérale ou organique) dans le milieu, mais généralement ils la décomposent, la réorganisent (en consommant pour cela de l'énergie) avant d'en faire leur propre matière : c'est une croissance «par l'intérieur», par opposition à la croissance «par l'extérieur» d'un cristal, dans le monde minéral. Ce dernier s'accroît en surface, en effet, à partir de sa solution saturée, tout en gardant une certaine symétrie. Il peut aussi se fragmenter, disparaître, avoir des formes variables en fonction des paramètres du milieu, mais tout cela n'a rien à voir avec la vie, même si cela la mime parfois.

Les êtres vivants ont la capacité unique d'extraire de l'énergie à partir de leur environnement et de la transformer pour construire leurs propres structures. Celle-ci se présente soit sous une forme physique : radiations lumineuses, soit sous la forme de molécules minérales ou organiques, qui sont modifiées et/ou dégradées pour libérer l'énergie contenue dans leurs liaisons chimiques. L'énergie ainsi produite est aussi transformée en travail mécanique (à l'échelle des cellules et des organismes), en travail osmotique (échanges ioniques) ou simplement en chaleur. En l'absence de toute croissance, le simple renouvellement permanent des constituants de la matière vivante (***turn-over***) et l'entretien des structures spécifiques exige la mise en œuvre des mêmes processus. Cette activité chimique, appelée **métabolisme**, implique des échanges permanents de matière et d'énergie avec l'environnement ; l'absence absolue de tels échanges est le seul vrai signe de mort (à l'exception des cellules congelées à très basse température et capables de «revivre», après réchauffement).

Le métabolisme constitue un ensemble hautement intégré de réactions chimiques ayant trois fonctions précises : 1) extraction et stockage de l'énergie, 2) transformation des molécules exogènes en matériaux de construction de la cellule (précurseurs), grâce à cette énergie et 3) assemblage de ces précurseurs en macromolécules à fonctions structurales, catalytiques et informationnelles. Sur la base de ce découpage, on distingue : le **métabolisme énergétique**, le **métabolisme intermédiaire** et le **métabolisme relatif aux macromolécules** ; les deux premiers sont étroitement interconnectés en un réseau complexe de réactions montrant une remarquable unité au sein de l'ensemble du monde vivant.

Le métabolisme peut aussi être divisé en deux phases principales : le **catabolisme** et l'**anabolisme**, qui ont lieu simultanément dans les cellules et sont eux aussi étroitement interconnectés au niveau de nombreux métabolites communs.

Le premier est représenté par toutes les étapes dégradatives dans lesquelles des molécules complexes : glucides, lipides, protéines (aliments venant du milieu extérieur ou réserves faites par les cellules), sont décomposées en éléments organiques plus simples, et même le plus souvent en composants minéraux (CO_2, H_2O et NH_3). Au cours de ces étapes, l'énergie potentielle (ou **énergie libre**) contenue dans les liaisons chimiques des molécules complexes initiales est stockée sous la forme d'une molécule universelle : l'**ATP**, dans ses liaisons dites «à haut potentiel énergétique». Une partie des chaînons carbonés n'est cependant pas complètement dégradée et est «mise de côté» pour servir de précurseurs dans l'anabolisme. Celui-ci est une phase de synthèse dans laquelle les précurseurs simples sont, grâce à l'énergie accumulée, transformés en macromolécules spécifiques : polysaccharides, protéines et acides nucléiques. Cette transformation correspond à une augmentation d'ordre, associée à l'augmentation de la complexité des molécules ; ce processus entraîne une diminution d'entropie des systèmes cellulaires et exige une grande consommation d'énergie.

Chaque réaction du métabolisme est catalysée par une enzyme particulière ; ces enzymes fonctionnent selon des chaînes de dégradation ou de synthèse comptant jusqu'à vingt étapes différentes (un exemple de chaîne de biosynthèse simple est donné dans la figure 4.2). Ces chaînes n'ont pas le plus souvent de réalité physique ou structurale mais on a mis en évidence, dans un nombre limité de cas, l'existence de complexes multienzymatiques catalysant séquentiellement plusieurs réactions chimiques. Dans les cellules eucaryotiques, elles sont cependant souvent séparées dans des compartiments distincts et font l'objet de régulations spécifiques.

1.4. Capacité de réaction

Cette expression recouvre une grande diversité de phénomènes et de mécanismes caractérisant à la fois les êtres vivants et la matière vivante elle-même ; ils peuvent en effet être décrits à toutes les échelles d'analyse : les organismes, les cellules et même les molécules isolées.

Les réactions des organismes animaux à des stimuli externes, physiques ou chimiques, sont bien connues ; elles mettent en jeu divers systèmes ou appareils : sensoriel, nerveux, musculaire…, souvent d'une grande complexité structurale, et qui induisent des réponses comportementales élaborées. Bien que des systèmes non vivants appartenant au domaine de la cybernétique puissent mimer certains comportements typiques du vivant, il n'y a pas de comparaison possible entre un moucheron et un robot, même sophistiqué, tous deux attirés par une source lumineuse ! Les Végétaux eux-mêmes, plutôt inertes en général, manifestent parfois des réactions rapides et visibles : mouvements des feuilles de la sensitive, des plantes carnivores… Certaines Bactéries sont sensibles au champ magnétique terrestre et orientent leur déplacement en fonction de celui-ci !

Au sein des organismes et des cellules, tous les mécanismes de régulation visant à maintenir l'équilibre physicochimique du milieu intérieur ou du contenu cellulaire, à court ou long terme (**homéostasie**), relèvent également de cette capacité de réaction des êtres vivants vis-à-vis de facteurs externes. Les exemples en physiologie animale ou végétale ne manquent pas et ce manuel en décrira plusieurs à l'échelle cellulaire.

Le niveau moléculaire offre lui aussi de multiples illustrations d'une capacité de réponse présentée par de nombreuses protéines. Les modifications de la conformation générale des enzymes, des récepteurs et des transporteurs membranaires, des protéines de régulation des gènes…, sous l'action d'effecteurs ou de ligands variés, s'accompagnent invariablement d'une modification de leur fonctionnement. Il faut bien comprendre que tout ce qui se manifeste à l'échelle visible, macroscopique, et qui touche au concept d'**excitabilité** au sens large, trouve en dernière analyse son origine dans cette propriété remarquable des macromolécules protéiques, et qui appartient en propre à la matière vivante.

1.5. Reproduction et évolution

La propriété la plus extraordinaire, et sans doute la plus caractéristique des organismes vivants, est leur capacité à se reproduire, c'est-à-dire à se perpétuer à travers une succession de générations. Cette production de copies identiques à soi revêt des modalités différentes, plus ou moins complexes, selon qu'il s'agit de multiplication asexuée ou sexuée, et selon qu'elle concerne des êtres unicellulaires ou pluricellulaires. À l'échelle cellulaire, la division représente à la fois le moyen d'augmenter l'effectif des populations de façon clonale (cas des êtres unicellulaires) et de multiplier leur nombre, tout en se différenciant, dans le cadre de la formation d'un organisme pluricellulaire. Dans tous les cas, lorsqu'on envisage une période de temps courte, relativement au temps de génération, la reproduction est caractérisée par une fidélité apparemment parfaite, ce qui constitue un avantage pour la survie d'une espèce adaptée à un milieu bien particulier.

La reproduction conforme des individus est parfois si parfaite que certaines espèces actuelles de Bactéries, de Plantes ou d'Animaux ressemblent à s'y méprendre à des espèces ayant vécu, pour les premières, il y a plusieurs milliards d'années, et pour les secondes, il y a plusieurs dizaines ou centaines de millions d'années. Il suffit de penser aux Cyanobactéries des stromatolithes (voir chapitre 15), au Mollusque primitif, appelé *Neopilina*, ancêtre des formes modernes, au Cœlacanthe et au Gingko… Toutes ces espèces, figées dans le temps et parfois appelées **fossiles vivants**, témoignent de l'extrême précision des mécanismes développés par les êtres vivants pour se reproduire à l'identique, sur des millions de générations successives. Et pourtant, il est heureux que tous n'aient pas été aussi parfaits, depuis l'émergence de la vie, car seuls les changements ont permis (et permettent encore) à l'évolution de se produire : si la première cellule avait mis au point un système de reproduction infaillible, elle existerait certes encore, mais elle serait seule, avec ses descendants, sur la planète bleue !

Après avoir rappelé les principales caractéristiques des êtres vivants, peut-on donner une définition complète de la vie ? Si la vie est bien ce qui permet de caractériser les êtres vivants actuels, il faut bien comprendre que, dans la mesure où elle est apparue à partir du monde minéral, il y a envi-

ron 3,5 milliards d'années, les premiers «systèmes vivants» étaient des objets (des êtres ?) beaucoup plus simples que ceux connus actuellement. Il ressort ainsi que les notions d'autoreproductibilité et d'évolution semblent fondamentales, avant celles de métabolisme et de structure, car elles peuvent déjà s'appliquer à des systèmes moléculaires élémentaires tels que les acides nucléiques, qui sont dotés de ces deux qualités, comme on le verra plus loin. La définition de la vie devrait être conçue et exprimée en termes plus larges que ceux généralement appliqués aux êtres vivants «traditionnels».

2. DES MOLÉCULES AUX ORGANISMES

2.1. Composition chimique globale de deux cellules types. Les biomolécules et leur hiérarchie

2.1.1. Analyse de la constitution de la matière vivante au niveau moléculaire

À titre d'exemples représentatifs de l'ensemble du monde vivant, une cellule bactérienne (*Escherichia coli*) et une cellule animale (cellule de foie de rat) sont analysées du point de vue de leur composition moléculaire. Cette étude nous permet de passer globalement en revue l'ensemble des constituants chimiques d'une cellule, mais surtout elle conduit à établir une hiérarchie dans ces constituants. Le rapport pondéral, la masse moléculaire moyenne ainsi que le nombre absolu de molécules par cellule sont donnés, pour chaque type cellulaire, dans le *tableau* 1.2.

Les principales remarques pouvant être faites au sujet de ces données sont les suivantes :

- l'**eau** représente la plus grande partie de la masse de la matière vivante : environ 75 % ;
- les **sels minéraux** sont très peu abondants mais leurs rôles, très divers, s'avèrent capitaux ;
- du point de vue de leur taille (masse moléculaire = MM), les molécules sont regroupées en trois familles : les **molécules minérales**, de faible MM (eau et sels minéraux), les **petites molécules organiques**, dont la MM va de 100 à 750 Da et les **macromolécules**, édifices géants dont les MM s'échelonnent de 10^4 à 10^{11} Da ; ces deux dernières catégories, spécifiques des êtres vivants, sont appelées **biomolécules** ;
- les molécules organiques (15 à 30 % de la masse fraîche) sont essentiellement représentées par les macromolécules : protéines et ARN ;
- du point de vue de la masse totale et du nombre absolu de molécules par cellule, on note pour chaque type cellulaire que, si les petites molécules organiques sont peu abondantes en masse, elles sont individuellement très nombreuses ; au contraire, les macromolécules sont très abondantes en masse, et beaucoup moins nombreuses avec, à la limite, le cas des molécules d'ADN dont on peut trouver une seule copie (chromosome) par cellule.

En ce qui concerne le nombre d'espèces de biomolécules, celui des petites molécules organiques (sucres simples, acides aminés, acides organiques, bases azotées…) est relativement limité : 50 à 200, au sein de chaque famille ; ces molécules sont présentes chez pratiquement tous les êtres vivants. En revanche, on montre que les macromolécules (ARN et protéines) sont très diverses : de plusieurs milliers d'espèces (*E. coli*) à plusieurs dizaines de milliers (foie de rat) ; elles se distinguent donc très nettement des précédentes à cet égard, et sont en fait à la base de la diversité des êtres vivants.

2.1.2. Hiérarchie des biomolécules

Il est possible d'établir une hiérarchie des biomolécules caractéristiques des êtres vivants, basée à la fois sur leur taille, leur nombre, leurs fonctions et leur organisation en structures de plus en plus complexes, qui font insensiblement passer de l'échelle moléculaire à l'échelle cellulaire (voir *figure* 1.1). Il existe une grande unité de composition chimique des constituants organiques «de base» (petites molécules organiques) au sein du monde vivant. Ils y jouent un double rôle de «briques» (**monomères**), pour construire des molécules de grande taille (**polymères** = macromolécules), et de précurseurs de ces mêmes briques, intervenant comme intermédiaires au cours de leur synthèse à partir de molécules plus simples, ou lors de leur dégradation. Les chaînes de synthèse qui relient ces composés entre eux sont remarquablement conservées, depuis les êtres les plus simples jusqu'aux plus complexes.

	Escherichia coli		Cellule hépatique de rat	
constituants (MM moyenne, en Da)	% du poids total	nombre de molécules par cellule	% du poids total	nombre de molécules par cellule
eau (18) ions inorganiques (40)	70 1-2	4.10^{10} $2{,}5.10^{8}$	75-85 1-2	$4{,}2.10^{13}$ $2{,}4.10^{11}$
petites molécules et précurseurs (100-300) lipides et précurseurs (750)	3-4 1-2	$2{,}5.10^{8}$ $2{,}5.10^{7}$	0,5-2 2-5	$1{,}4.10^{10}$ $2{,}5.10^{10}$
polysaccharides	1-2	/	2-10	/
protéines ($4\ .10^{4}$)	15	$3{,}6.10^{6}$	10-12	$2{,}5.10^{9}$
ARN (10^{4}-10^{6})	6	$4{,}6.10^{5}$	0,8-1	$1{,}5.10^{8}$
ADN	1	1-2 (MM = $2{,}5.10^{9}$)	0,4	44 chromosomes

Tableau 1.2

Comparaison des espèces moléculaires caractéristiques de deux types de cellules : procaryotique (*E. coli*) et eucaryotique (foie de rat)

L'hépatocyte de rat a un volume approximativement égal à 1 000 fois celui de la cellule bactérienne (2.10^{-9} cm^3, contre 2.10^{-12} cm^3). Une cellule de grain de maïs ou de blé contiendrait environ 10-15 % d'eau seulement, mais 70-75 % de polysaccharides (réserves d'amidon).

Le monde vivant, en revanche, manifeste une extrême diversité au niveau des macromolécules et des édifices qu'elles constituent. Chaque espèce vivante, chez qui on recense des milliers de types de protéines distinctes, est unique de ce point de vue ; c'est à cette échelle qu'il faut en fait rechercher l'origine de la **biodiversité**. Même des protéines ayant des fonctions similaires dans des espèces voisines (par exemple, l'hémoglobine chez les Animaux), présentent des compositions différentes. Seules quelques rares protéines (les histones chez les Eucaryotes, par exemple) montrent une composition qui a été bien conservée au cours de l'histoire des êtres vivants ; ceci est lié au fait qu'elles sont soumises à des contraintes évolutives très fortes, en raison de la grande spécificité de leurs fonctions. La diversité des protéines se retrouve évidemment dans les acides nucléiques qui constituent, dans toute cellule, le message héréditaire (ADN) et les outils de son expression (ARN). Ces deux types de **macromolécules informatives**, ainsi que les protéines, sont qualifiées de «codées» car leurs fonctions et surtout leur mode de synthèse les distinguent fondamentalement des autres biomolécules. Les macromolécules sont en général stabilisées par des liaisons faibles (non covalentes) et elles constituent des édifices fragiles mais souples, dans lesquels structure et fonction sont étroitement liées. Enfin, une caractéristique majeure des macromolécules est leur capacité à former, par assemblage spontané (**autoassemblage**) des édifices de grande taille, dits supramoléculaires (voir plus loin).

Certaines petites molécules organiques sont suffisamment simples du point de vue chimique pour pouvoir apparaître spontanément à partir d'un milieu minéral exclusif, comme cela a pu être le cas sur la Terre primitive, c'est-à-dire dans des

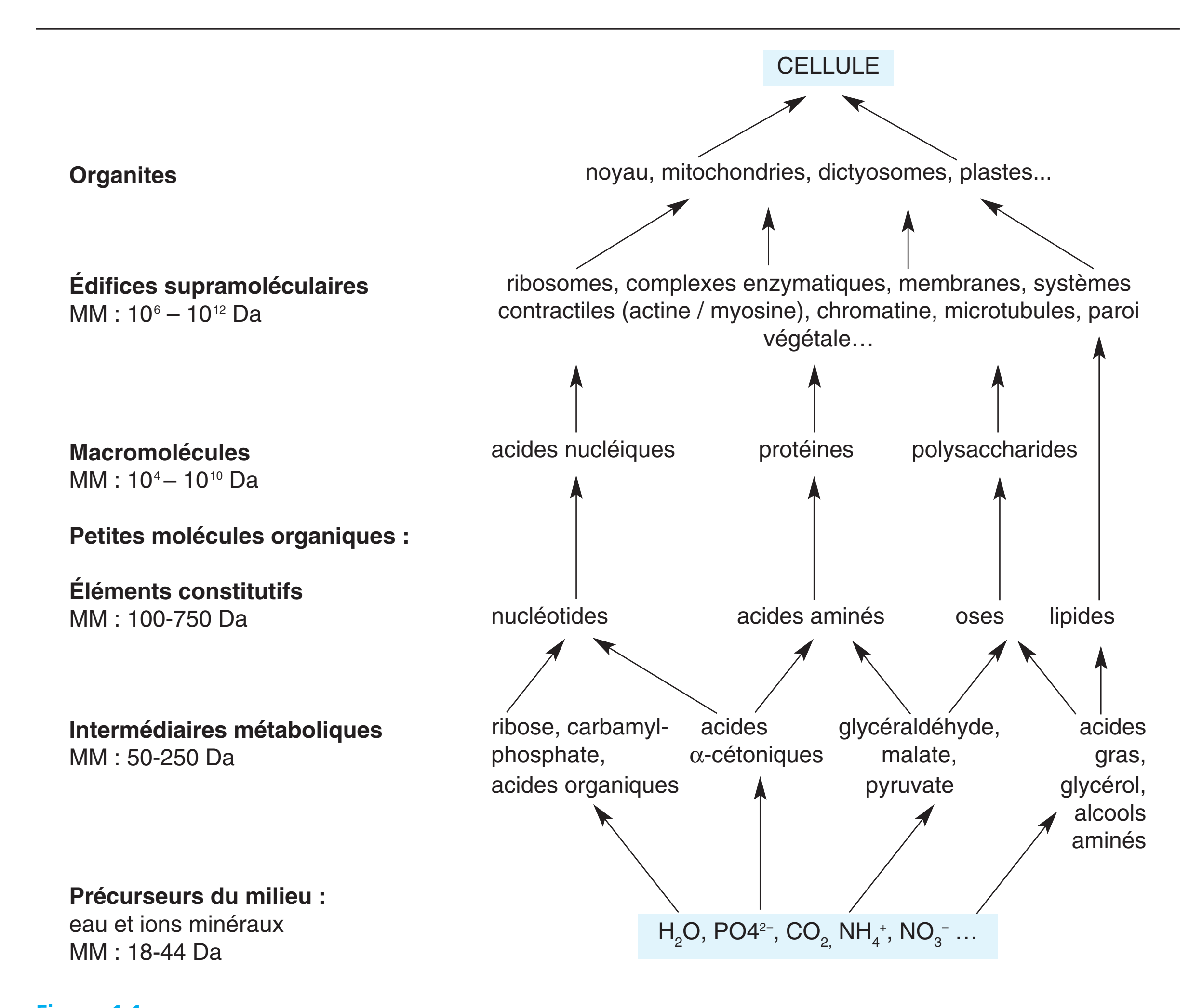


Figure 1.1

Hiérarchie de l'organisation des biomolécules au sein de la matière vivante, depuis les précurseurs minéraux du milieu, jusqu'aux organites et aux cellules

En raison de leur masse moléculaire relativement élevée, et surtout de leur participation directe à la constitution d'édifices supramoléculaires de grande taille (membranes), certains lipides structuraux doivent être mis à part, bien qu'ils ne soient pas des macromolécules.

conditions abiotiques (voir chapitre 15). Ces molécules sont aussi les premières que les chimistes ont su fabriquer de toutes pièces (synthèse de l'urée, en 1828, par WÖHLER, à partir de NH_3 et de cyanate de plomb). La synthèse des macromolécules, sous leur forme actuelle et selon les modalités mises en œuvre par les cellules, pose en revanche davantage de problèmes : on ne peut concevoir leur origine qu'à travers une très longue histoire encore mal connue (inconnaissable peut-être ?) au cours de laquelle se sont progressivement mis en place des mécanismes de polymérisation contrôlée. Les biochimistes savent actuellement synthétiser de telles macromolécules, mais au moyen de procédés n'ayant rien à voir avec les mécanismes spécifiquement biologiques.

Pour conclure, on peut dire que si les petites molécules biologiques peuvent être analysées comme n'importe quelle autre molécule (y compris synthétique), grâce aux méthodes de la biochimie, les macromolécules devront être étudiées et interprétées à la lumière d'une hypothèse historique. Celle-ci prévoit qu'elles sont le fruit d'une très longue évolution au cours de laquelle leurs interrelations sont devenues de plus en plus étroites et spécifiques, et grâce à laquelle a pu s'opérer un ajustement de plus en plus parfait entre tailles, formes et fonctions biologiques.

2.2. Autoassemblage et édifices supramoléculaires

Le phénomène d'**autoassemblage** est défini comme l'association spontanée de molécules pour former des édifices de grande taille, dits **supramoléculaires**, qui jettent un pont entre le monde des molécules et celui des structures cellulaires. Ces édifices sont des agrégats, formés d'un grand nombre de sous-unités identiques ou différentes, de même nature moléculaire ou pas ; ils peuvent être obtenus *in vitro*, à partir de leurs seuls constituants purifiés. À une échelle différente, on peut grossièrement comparer ce phénomène à celui qui préside à la formation des cristaux minéraux à partir de leurs atomes ou de leurs ions constitutifs.

Les liaisons stabilisant ces édifices sont de faible énergie, de sorte qu'ils restent en général relativement instables et peuvent manifester des propriétés dynamiques (réversibilité) que ne possèdent pas des structures moléculaires construites uniquement à partir de liaisons covalentes. La notion d'autoassemblage est fondamentale en biologie et c'est probablement en elle que réside le «secret» (ou un des «secrets») de la vie. Plusieurs niveaux de complexité dans ce phénomène peuvent être envisagés, depuis la simple formation des bicouches phospholipidiques jusqu'à la construction des Virus ou des ribosomes.

2.2.1. Autoassemblage des phospholipides

Bien que de taille modeste, ces molécules ont la propriété de s'organiser spontanément, en phase aqueuse, en un nombre limité de structures simples, en particulier celles appelées **bicouches**. Il s'agit, comme on l'étudiera en détail dans le chapitre 5, d'un phénomène proche de la cristallisation, qui est lié à une propriété physicochimique remarquable de ces molécules, à savoir l'**amphiphilie**. La portée de ce mécanisme élémentaire est considérable car il est à l'origine, au cours de l'histoire de la vie, de l'apparition des membranes biologiques et des processus de compartimentation sans lesquels elle n'aurait pu voir le jour (voir chapitre 16).

2.2.2. Autoassemblage des macromolécules

Les protéines, certains polysaccharides et les acides nucléiques ont la capacité de former des édifices supramoléculaires très divers, dont certains sont finis, c'est-à-dire ont une taille limitée, tandis que d'autres sont théoriquement infinis.

• Les exemples d'édifices simples formés uniquement de protéines globulaires sont très nombreux en biochimie ; beaucoup d'enzymes, en effet, sont constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes, associées en structures dites quaternaires, stabilisées par des liaisons faibles (protéines oligomériques). L'exemple de l'hémoglobine, qui est un tétramère ($\alpha 2$-$\beta 2$), est bien connu. De tels édifices peuvent se construire lorsque les protéines possèdent à leur surface un site de fixation complémentaire d'une région appartenant soit à leur propre structure, soit à une autre molécule. On décrit tous les intermédiaires entre un simple dimère symétrique, formé de deux sous-unités identiques, et de gros édifices assurant des fonctions enzymatiques multiples et complexes, tels que la pyruvate déshydrogénase (60 chaînes, de 3 types différents !) ou l'acide gras synthétase, pour ne parler que des plus classiques. De même, on peut signaler les molécules fibreuses de collagène, formées de trois chaînes polypeptidiques élémentaires disposées parallèlement en hélice, ou de kératine, elles-mêmes formées de quatre sous-unités.

• Il existe aussi des édifices protéiques de très grande taille, théoriquement illimitée, construits sur un principe différent. Dans ce cas, les molécules globulaires de base, en général identiques, possèdent au moins deux sites de reconnaissance complémentaires et opposés, de sorte qu'on peut aligner les monomères, à la queue leu leu, indéfiniment ; des édifices finis peuvent aussi être réalisés sur ce principe. Selon la disposition exacte et le nombre des sites, on obtient des filaments simples, des hélices, des feuillets plans, des tubes, des anneaux, des sphères… Des protéines fibreuses ou des polysaccharides linéaires, comme la cellulose, peuvent aussi s'organiser en faisceaux parallèles formant de longs câbles résistants ; dans ce cas, ce sont des interactions latérales très nombreuses (le plus souvent des liaisons hydrogène) qui stabilisent les édifices.

• On doit enfin signaler la possibilité de former des édifices supramoléculaires mixtes, réunissant des molécules de nature chimique différente : protéines et acides nucléiques, par exemple, ou bien bicouches phospholipidiques et protéines.

2.2.3. Quelques exemples d'édifices supramoléculaires classiques

On trouve des exemples d'édifices de ce type dans pratiquement tous les aspects de la vie des cellules ; nous nous contenterons ici d'en signaler quelques-uns, pour montrer leur diversité et celle de leurs fonctions, et nous renverrons le lecteur aux chapitres correspondants.

• Les **ribosomes** sont des édifices mixtes, ribonucléoprotéiques, de grande taille (15 à 20 nm de diamètre, selon leur origine), participant au décryptage du message génétique contenu dans la séquence des ARN messagers et à sa traduction en une séquence ordonnée d'acides aminés (voir chapitres 4, 9 et 10).

• Les particules ribonucléoprotéiques dites **PRS** et **complexes d'épissage** interviennent respectivement dans la synthèse des protéines et la maturation des ARN messagers chez les eucaryotes (voir chapitres 8 et 9).

• Le feutrage de **clathrine**, qui tapisse la face hyaloplasmique des vésicules d'endocytose et de certaines vésicules bourgeonnant à partir des saccules golgiens, permet leur formation à partir de surfaces membranaires planes (voir chapitre 9).

• Les **microfilaments** d'actine, les **microtubules** formés de tubuline, les **filaments intermédiaires** (kératine, vimentine...), sont des édifices de grande taille, qui constituent le cytosquelette et interviennent dans les mouvements et dans l'architecture cellulaire (voir chapitre 11).

• Les **flagelles bactériens** (souples), les **pili** (rigides), sont de longs appendices trouvés à la surface cellulaire et jouant respectivement un rôle dans la motilité et la reconnaissance chez les cellules bactériennes (voir chapitres 2 et 11).

• Les fibres de collagène, chez les Animaux, ou les fibrilles de cellulose, chez les Végétaux, sont des composantes des **matrices extracellulaires**, dont les fonctions sont extrêmement diversifiées (voir chapitre 14).

• La formation des **particules virales**, au cours du cycle des Virus, met en œuvre des mécanismes d'autoassemblage d'une grande complexité, impliquant à la fois des protéines et des acides nucléiques ; leur morphogenèse a constitué historiquement un système modèle pour l'analyse de ce type de processus (voir chapitre 15).

2.3. Échelles de dimensions et de temps

Le monde des cellules est bien étranger à tout ce qui nous est donné d'observer quotidiennement. Or, il existe en nous et partout autour de nous : il existe chez tous les êtres vivants, les Animaux, les Végétaux et les Bactéries, celles du sol que nous foulons et celles que nous hébergeons sans en avoir conscience. Le lecteur de ces lignes est constitué, en propre, d'environ 50 000 milliards de ces unités de vie que sont les cellules. Ce monde est invisible à l'œil nu, car son pouvoir de résolution ne descend pas en dessous de 0,1 mm, et les cellules sont restées inconnues jusqu'au milieu du XVIIe siècle, époque à laquelle les premiers instruments d'optique ont permis leur observation. Les cellules se mesurent donc avec une unité peu familière : le **micromètre** (millième de mm ; 10^{-6} m, noté µm) ; une cellule animale moyenne a un diamètre voisin de 20 µm et une petite bille de 1 mm de diamètre en contient plus de 100 000 ! Et que dire de l'univers des Bactéries, dont les dimensions sont 10 fois plus faibles encore, et chez qui l'on rencontre les plus petits des êtres vivants (0,1 à 0,2 µm de longueur).

Dans l'échelle des tailles, les cellules sont situées à mi-chemin entre le monde des molécules, dont elles sont formées, et le monde des organismes, dont elles sont les éléments constitutifs. L'unité utilisée dans le premier est le **nanomètre** (millième de micromètre ; 10^{-9} m, noté nm). La molécule d'eau a un diamètre voisin de 0,1 nm, les «petites molécules» dont il est fait état dans le *tableau* 1.2 ont des tailles de l'ordre de 0,5 à 1,5 nm tandis que les macromolécules protéiques globulaires atteignent des diamètres de 4 à 10 nm. Nous avons vu que ces dernières peuvent cependant constituer des édifices supramoléculaires beaucoup plus grands, qui empiètent sur le domaine des dimensions cellulaires. Dans le monde des organismes pluricellulaires, on utilise enfin des unités familières, le millimètre, le centimètre ou bien le mètre pour mesurer les Animaux ou les Végétaux, des plus petits aux plus grands.

Le diagramme de la *figure* 1.2 présente divers objets biologiques appartenant à ces trois mondes, en y ajoutant une quatrième catégorie, celle des Virus qui s'intercalent par leurs dimensions entre les deux premiers, mais dont nous verrons plus loin qu'ils ne sont ni des molécules banales ni des êtres vivants à proprement parler ; huit ordres de grandeur séparent la plus petite des Bactéries du plus gros des Animaux !

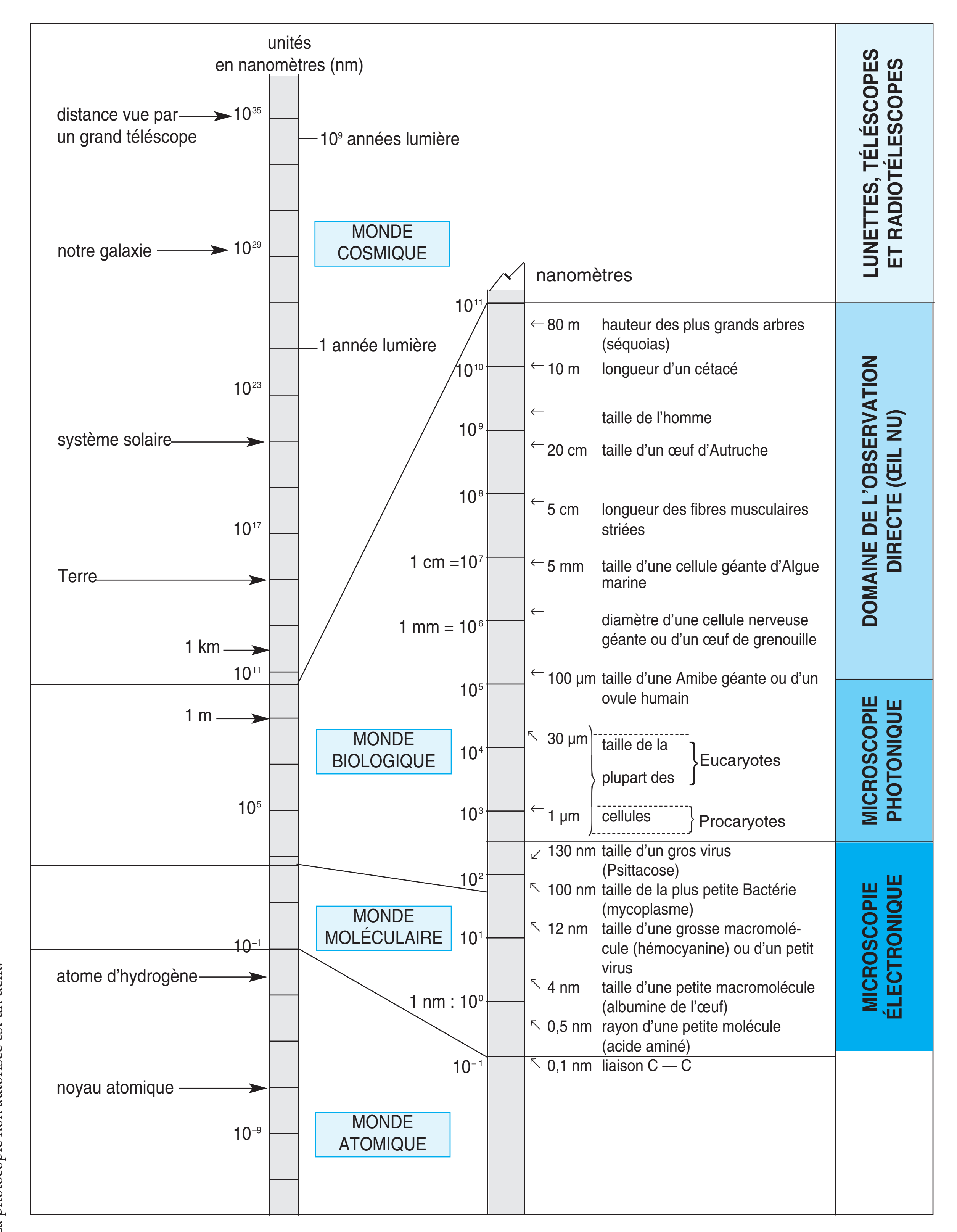


Figure 1.2
Diagramme représentant l'échelle des dimensions aux niveaux atomique, moléculaire, biologique et cosmique
L'unité choisie est le nanomètre. (D'après A. Lehninger, 1974).

Ce classement en différents niveaux d'organisation correspond en fait à trois types d'approche classiques en biologie et trois catégories de disciplines qui ont des objectifs identiques à des échelles différentes ; ces disciplines étudient la structure des objets, leurs fonctions et leur perpétuation. On distingue :

– l'approche dite « organismique », représentée par la morphologie, l'anatomie, la physiologie générale, l'embryologie et la génétique formelle ;

– l'approche cellulaire, représentée par la cytologie et l'histologie (classique ou électronique), la physiologie cellulaire et la cytogénétique ;

– l'approche moléculaire, représentée par la biophysique et la biochimie, la génétique moléculaire et la biologie moléculaire.

Le seul critère de taille ne suffit cependant pas à classer précisément les objets biologiques et les êtres vivants ; l'histoire de la biologie a montré qu'il faut distinguer, au sein de ce qui pourrait paraître un continuum, plusieurs discontinuités fondamentales. Nous verrons aussi qu'il existe dans chaque subdivision une grande variabilité, que nous évoquerons plus loin.

L'étendue des ordres de grandeur dans l'espace qui vient d'être décrite trouve son parallèle, amplifié, dans l'étendue considérable des durées sur lesquelles les biologistes sont amenés à travailler (voir *figure* 1.3). Les phénomènes les plus rapides que la biophysique analyse sont de l'ordre de 10^{-12} seconde, alors que certains êtres vivants (parmi les Végétaux) ont des durées de vie de plusieurs milliers d'années ! Dans cette gamme qui ne couvre pas moins de 23 ordres de grandeur, la vie des cellules s'échelonne de quelques minutes à quelques dizaines d'années.

2.4. Grandes discontinuités au sein du monde vivant

La première des discontinuités, déjà étudiée mais sur laquelle il est utile de revenir, est celle qui sépare le vivant du non-vivant : n'entend-on pas dire parfois que le cuir, le bois, la soie, sont des matériaux nobles car vivants ! Ils ne sont en fait pas plus vivants qu'un bloc de charbon, une goutte de pétrole ou un morceau de polystyrène ! Est vivant, seulement, un organisme qui remplit l'ensemble des conditions énumérées au début de ce chapitre, bien que dans certains cas de parasitisme, en particulier chez les Bactéries, les choses ne soient pas toujours aussi claires. À cet égard, les Virus ne peuvent être qualifiés de vivants car, en raison de leur extrême simplicité, ils ne présentent pas les caractéristiques typiques des cellules, ils ne manifestent aucun métabolisme indépendant, et enfin ils ne se reproduisent pas de façon autonome mais sont reproduits par les cellules qui les hébergent, au même titre que leurs molécules ou leurs structures propres (voir chapitre 15).

Le monde des cellules est subdivisé en deux grands groupes qui sont fondamentalement différents sur la base de leur structure interne et de leur organisation générale ; il s'agit des **Procaryotes** et des **Eucaryotes**. Les premiers recouvrent les Bactéries, au sens large, tandis que les seconds sont

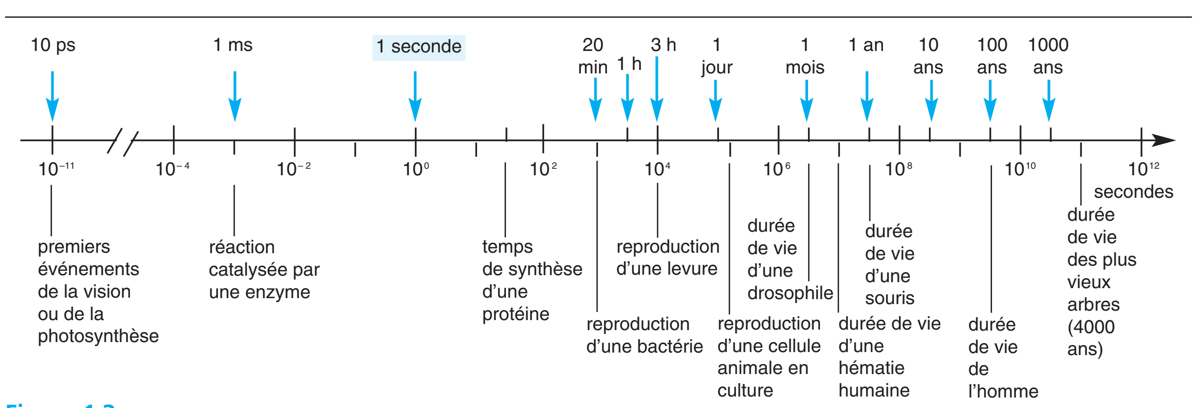


Figure 1.3

Diagramme représentant l'échelle des vitesses et des durées caractéristiques de quelques processus dans les systèmes biologiques

L'unité choisie est la seconde.

représentés à la fois par des micro-organismes unicellulaires : les Protistes, mais surtout par des êtres pluricellulaires : les Algues, les Champignons, les Végétaux et les Animaux. Il existe réellement une solution de continuité entre ces deux univers, que nous analyserons dans le chapitre suivant. Au sein des Procaryotes, on décrit en outre une discontinuité tout aussi fondamentale, beaucoup plus discrète et de découverte assez récente, qui non seulement les sépare en deux ensembles, mais qui subdivise en fait l'ensemble du monde vivant en trois règnes primaires : les **Archaea**, les **Bacteria** et les **Eucarya**. En conséquence, les idées sur l'origine des cellules et leur évolution sont depuis peu complètement renouvelées (voir chapitre 16).

Une autre discontinuité importante, au sein des Eucaryotes cette fois-ci, concerne celle séparant les êtres unicellulaires des pluricellulaires ; la réalisation de sociétés multicellulaires, autres que de simples colonies, représente un saut évolutif considérable (voir chapitre 14). Celui-ci a vraiment permis à la vie la «sortie des eaux», la conquête efficace et durable du milieu terrestre et aérien. La distinction entre Animaux et Végétaux (les Champignons sont mis à part, car ils possèdent de nombreuses caractéristiques chimiques et physiologiques originales), constitue enfin la dernière des subdivisions au sein des organismes vivants. Nous présenterons plus loin les caractères trophiques essentiels sur lesquels ce découpage est basé.

On doit enfin souligner que ces discontinuités ne se superposent pas exactement, en raison de la diversité des êtres vivants, aux trois domaines de taille décrits plus haut. De même qu'on trouve des édifices macromoléculaires plus gros que certains petits Virus, on trouvera des Virus aussi gros que les plus petites cellules vraies. Malgré leur simplicité structurale, quelques cellules procaryotiques dépassent en taille des cellules eucaryotiques animales ou végétales, et même les plus petits organismes pluricellulaires (un exemple spectaculaire de Bactérie mesurant plus d'1 mm de long vient d'être confirmé il y a peu). Certaines cellules eucaryotiques (très différenciées, il faut le reconnaître !) ont des dimensions atteignant l'échelle du centimètre ou du mètre, comparables à celles attribuées en général aux organismes pluricellulaires complexes. Dans le règne animal, il suffit de penser aux œufs des Amphibiens, des Oiseaux ou des Reptiles (autruches ou dinosaures, pour prendre les plus classiques) ou aux prolongements des cellules nerveuses. Dans le règne végétal, on connaît aussi des Algues unicellulaires géantes ou possédant des cellules géantes (*Acetabularia*, *Chara*…). Certains organismes pluricellulaires inférieurs ne sont pas plus volumineux que de nombreux Protistes, à tel point que les plus complexes parmi ces derniers (les Ciliés, en particulier ; voir chapitre 2) ont parfois été considérés comme des «pluricellulaires dégénérés» ou bien possédant une structure «non cellulaire».

La diversité des tailles et des morphologies des cellules, et celle des sociétés qu'elles forment, représente bien une des caractéristiques majeures du monde vivant ; au-delà du caractère unitaire de ce dernier, elle constitue, pour l'observateur de la nature, une fascination permanente.

3. TRANSFORMATIONS DE MATIÈRE ET D'ÉNERGIE DANS LE MONDE VIVANT

Nous venons de voir que tous les êtres vivants sont caractérisés par une activité chimique leur permettant de croître et de renouveler en permanence leurs constituants (métabolisme) ; en plus de l'eau, leurs besoins communs concernent :
– une source de carbone (minéral ou organique) ;
– une source d'énergie (physique ou chimique) ;
– une source de pouvoir réducteur (minéral ou organique) ;
– diverses sources d'éléments minéraux (N, P, S…).

On appelle **type trophique** un ensemble d'êtres vivants utilisant les mêmes procédés pour prélever et transformer leurs aliments afin d'en fabriquer leur propre matière. Comme on le verra, la diversité des types trophiques ne résulte pas d'une simple combinatoire entre diverses possibilités chimiques.

3.1. Autotrophie et hétérotrophie

Les êtres vivants peuvent tout d'abord être classés en deux grands groupes, en fonction de la forme chimique du carbone qu'ils prélèvent dans le milieu :
– les **autotrophes**, ou êtres qui «se nourrissent de manière autonome», utilisent le dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique (0,036 %) ou dissous dans l'eau ;

– les **hétérotrophes**, ou êtres qui «se nourrissent aux dépens des autres», prélèvent le carbone sous une forme organique déjà très élaborée (réduite) et fabriquée par les autotrophes, qui sont donc les producteurs primaires de la biosphère ; les hétérotrophes dépendent ainsi complètement de ces derniers pour leur survie.

Les autotrophes sont essentiellement représentés par les Végétaux verts : Plantes et Algues, réalisant la **photosynthèse** et fixant directement le CO_2 grâce à l'énergie lumineuse captée au moyen de pigments spécialisés (**photolithotrophes**). On connaît aussi de nombreux Procaryotes qui ont cette capacité : les Cyanobactéries, les Bactéries dites «vertes» et «pourpres» sulfureuses et certaines Archébactéries (*Halobium*). Quelques organismes, uniquement bactériens, non photosynthétiques, peuvent aussi fixer le CO_2 libre : ce sont les **chimiolithotrophes** (un sous-groupe des chimiotrophes ; voir plus loin) ; ils sont capables d'oxyder des composés minéraux pour en tirer de l'énergie. Tous les autotrophes prélèvent leurs autres éléments dans l'environnement sous forme de sels minéraux ou de gaz (par exemple, l'azote sous forme de NH_4^+, NO_3^- ou même N_2).

Les hétérotrophes sont surtout représentés par les Animaux, les Champignons et un très grand nombre de Bactéries qui se nourrissent de petites molécules telles que les sucres, les acides aminés, les acides organiques ou les nucléotides, dont ils tirent à la fois leur énergie (par oxydation) et leurs chaînons carbonés constitutifs. On distingue parmi eux les **phagotrophes** et les **osmotrophes.**

• Les cellules phagotrophes (= phagocytes) prélèvent leur alimentation dans le milieu sous forme de particules de grande taille, grâce au phénomène de phagocytose ; c'est le cas de nombreux Protistes et des Invertébrés inférieurs (Spongiaires, Cnidaires).

• Les cellules osmotrophes prélèvent leur alimentation dans le milieu sous forme dissoute (glucides, acides aminés…) grâce à des systèmes de transport spécifiques localisés dans la membrane plasmique. La grande majorité des cellules constituant les organismes pluricellulaires sont osmotrophes ; seuls quelques phagocytes spécialisés dans la défense de l'organisme (les macrophages ou les leucocytes dits polynucléaires, par exemple), n'entrent pas dans cette catégorie.

3.2. Phototrophie et chimiotrophie

Un autre découpage peut être fait en fonction de la nature de la source d'énergie prélevée dans l'environnement :

– les **phototrophes** utilisent la lumière solaire (l'énergie des photons), captée grâce à des pigments chlorophylliens ; ils sont donc photosynthétiques ;

– les **chimiotrophes** utilisent des réactions d'oxydoréduction spontanées génératrices d'énergie ; ceux-ci sont capables d'oxyder soit des molécules organiques : chimio-organotrophes, soit des molécules minérales : chimiolithotrophes.

Pour réduire le CO_2 en matière organique, la plupart des organismes phototrophes utilisent des donneurs d'électrons minéraux (H_2S ou H_2O) ; ils sont alors photolithotrophes et parfaitement autotrophes car ils n'utilisent que des éléments minéraux pour aliments (voir la liste donnée plus haut). Il existe cependant un petit groupe d'êtres vivants (les Bactéries «vertes» et «pourpres» non sulfureuses) qui captent la lumière comme source d'énergie mais utilisent des molécules organiques comme source d'électrons pour réduire le CO_2 : ce sont des **photo-organotrophes** (et donc des hétérotrophes).

Les **chimio-organotrophes** requièrent comme donneurs d'électrons des molécules organiques complexes (qu'ils oxydent), et sont nécessairement des hétérotrophes. Ils constituent, avec les Végétaux verts photosynthétiques, la grande majorité des êtres vivants de la biosphère : il s'agit des Animaux, des Champignons et des micro-organismes non photosynthétiques. Ils oxydent, pour la plupart, les molécules organiques en CO_2 et H_2O grâce au dioxygène (O_2) : c'est la **respiration**. De nombreuses bactéries, comme *Escherichia coli*, peuvent (en conditions anaérobies), utiliser NO_3^- à la place de O_2, et le réduire en NO_2^- : c'est la «respiration des nitrates».

Les chimiolithotrophes sont, par contre, tous des Bactéries ; ils présentent une très grande diversité de métabolismes oxydatifs et sont, le plus souvent, des autotrophes (dits **chimiosynthétiques**). Ils sont capables d'oxyder les différents composés minéraux réduits suivants : H_2, NH_4^+, NO_2^-, H_2S, thiosulfates, S, Fe^{2+} en utilisant comme accepteurs d'électrons des composés oxydants tels que : O_2 (êtres aérobies), ou bien NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_2 (êtres anaérobies). A titre d'exemples, on peut signaler :

– les **Bactéries nitrifiantes** et **dénitrifiantes** du sol, qui ont des actions antagonistes dans le cycle de l'azote. Les premières, aérobies strictes, oxydent NH_4^+ en NO_2^-, puis en NO_3^- grâce à l'oxygène ; les secondes, en conditions anaérobies, peuvent oxyder le soufre et ses composés réduits en réduisant NO_3^- en N_2 gazeux ;

– les **Bactéries sulfureuses** non photosynthétiques, aérobies, oxydant le soufre et ses dérivés réduits, et qui produisent H_2SO_4 ; ce sont de redoutables agents de corrosion du calcaire (maladie des monuments dans les villes). D'autres espèces, au contraire, sont anaérobies et réduisent les sulfates en H_2S en oxydant le dihydrogène et éventuellement certains composés organiques (respiration des sulfates) ;

– les **Bactéries oxydant les ions ferreux** (Fe^{2+}) en ions ferriques (Fe^{3+}) et qui sont susceptibles de constituer des amas visqueux capables d'obstruer les canalisations en fer ;

– les **Bactéries méthanogènes** (Archébactéries) anaérobies du sol et des marais, qui oxydent H_2 et parfois certains composés organiques, en réduisant le CO_2 en méthane (CH_4).

Ces quelques lignes ne peuvent pas rendre compte de l'immense diversité des métabolismes bactériens, détaillée seulement dans les ouvrages de Microbiologie.

3.3. Organismes aérobies et anaérobies

Parmi les organismes vivants, on distingue enfin deux grandes familles, selon qu'ils utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons dans leurs réactions d'oxydoréduction (êtres qui respirent, ou **aérobies**), ou bien qu'ils utilisent d'autres molécules, minérales ou organiques, comme acceptrices (êtres **anaérobies**). Ces derniers sont divisés en deux groupes :

– les **anaérobies stricts** (ou obligatoires) qui ne tolèrent pas l'O_2, qui est pour eux un poison. On peut citer, par exemple : les Bactéries méthanogènes et des Bactéries du sol, comme les Clostridies fermentaires ;

– les **anaérobies facultatifs**, qui s'adaptent à la présence ou à l'absence d'O_2. On peut citer la levure de bière (Eucaryote), ou *Escherichia coli* (Procaryote) ; ces êtres sont capables, selon les conditions de l'environnement, d'un métabolisme oxydatif ou d'un métabolisme fermentaire.

Toutes ces distinctions doivent être modulées chez les organismes supérieurs car, chez ceux-ci, différents types métaboliques peuvent coexister dans l'espace et/ou dans le temps : chez les Plantes vertes, toutes les cellules ne sont pas, à l'évidence, chlorophylliennes et autotrophes (celles des racines ou des tissus aériens profonds, en particulier). Les Plantes vertes à l'obscurité fonctionnent comme hétérotrophes, ainsi que les graines en germination ; toutes les Plantes supérieures ne sont pas vertes et chlorophylliennes (plantes parasites), etc.

3.4. Flux d'énergie et cycles des éléments

Comme on vient de le montrer, les êtres vivants manifestent une interdépendance nutritionnelle absolue : schématiquement, les autotrophes et les hétérotrophes se nourrissent mutuellement (on parle parfois de **syntrophie**, ce terme pouvant s'appliquer dans certains cas à un même organisme). Les premiers utilisent, essentiellement grâce à la lumière, le CO_2 atmosphérique et rejettent l'O_2 pour produire des composés organiques (**producteurs primaires**) alors que les seconds font exactement l'inverse : ils oxydent le glucose formé par les organismes autotrophes pour en tirer l'énergie et restituent simultanément le CO_2 à l'atmosphère (**producteurs secondaires** et **décomposeurs**). Deux cycles sont donc, à travers ce qu'on appelle des **chaînes trophiques**, étroitement

COMMENTAIRE

Flux et cycle du carbone

Le courant d'énergie qui part du soleil et traverse ainsi la biosphère est considérable et met en jeu des quantités d'énergie sans commune mesure avec celles dont l'homme est responsable, à travers ses diverses activités et au moyen de ses machines. On considère que, grâce à lui, 30 à 50 milliards de tonnes de carbone circulent annuellement dans le cycle de cet élément, à la surface de la Terre, sous l'effet de la photosynthèse et de la respiration. Les deux réservoirs les plus directement impliqués dans ces échanges sont le CO_2 atmosphérique (également en équilibre avec les roches calcaires, *via* les bicarbonates dissous) et les constituants organiques de la matière vivante (auxquels il faut ajouter les réserves fossiles, épuisables, de charbon et de pétrole…). Les roches calcaires et les réserves fossiles représentent les réserves de carbone de loin les plus importantes ; voir *figure* 1.4.

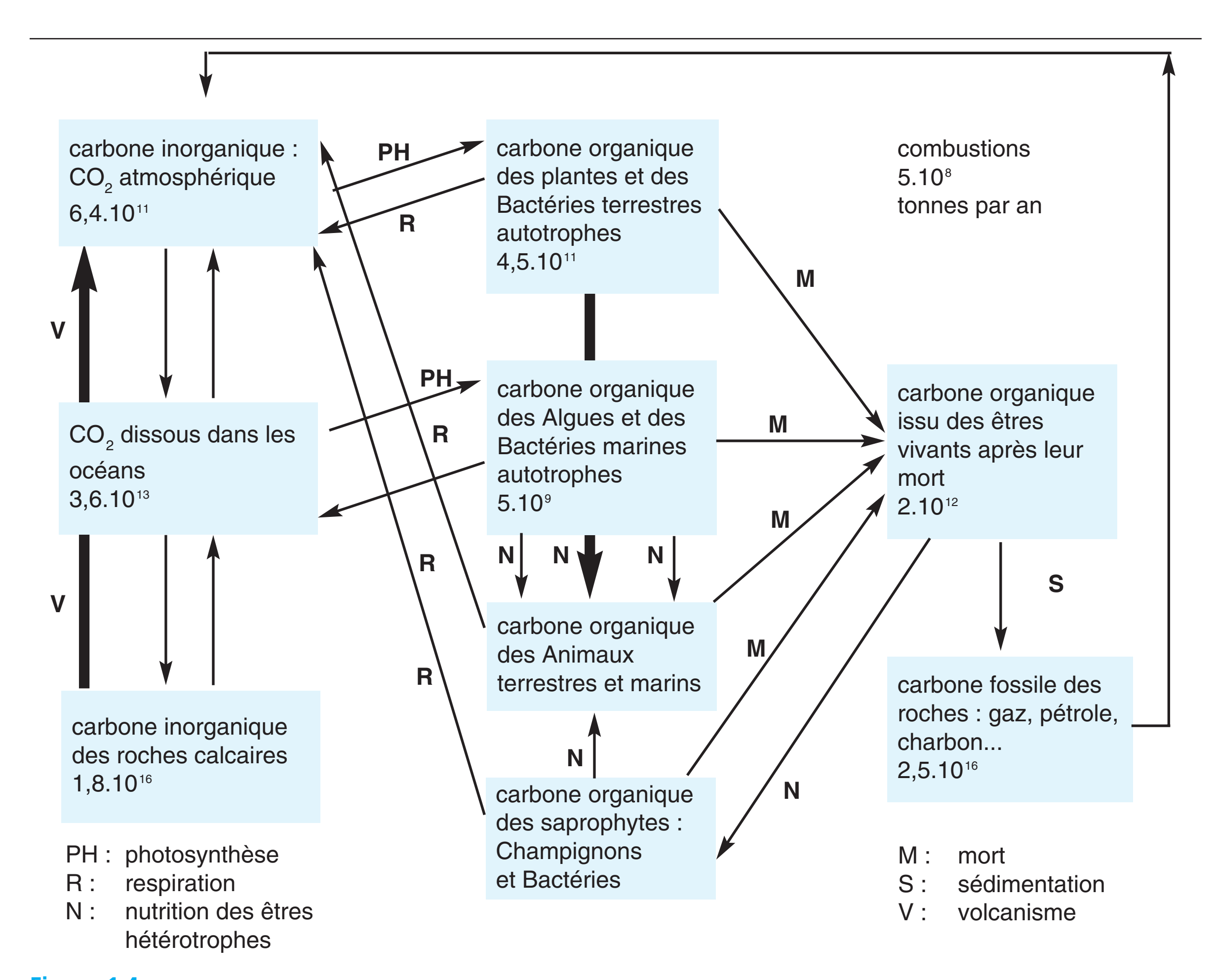


Figure 1.4

Schéma du cycle du carbone sur la Terre

Les tonnages relatifs à l'assimilation (photosynthèse : PH, et chimiosynthèses) et à la respiration (R) sont en équilibre, à une valeur voisine de $8,5.10^{10}$ tonnes de C par an. La mort des êtres vivants (M) restitue au milieu 6.10^{10} tonnes de C organique par an, tandis que la sédimentation (S) convertit 10^7 tonnes de C par an en C fossile. Le volcanisme est à l'origine de la production de 2.10^9 tonnes de C (sous forme de CO_2) par an. Les valeurs indiquées dans les différentes cases représentent les masses de carbone disponibles, exprimées en tonnes.

associés au cycle global de l'énergie dans la nature : celui de O_2 et celui de C ; le moteur de ces cycles est l'énergie solaire. Il vaudrait mieux cependant parler de flux unidirectionnel d'énergie puisque seule celle provenant du soleil est renouvelée en permanence ; de plus, une grande partie de cette énergie se trouve finalement dissipée, à l'occasion de phénomènes proprement biologiques : métabolisme, transports, contraction…, en chaleur et entropie, qui sont des formes d'énergie «dégradées» et inutilisables par les êtres vivants.

Le dernier élément faisant l'objet d'un cycle de grande ampleur au sein de la biosphère est l'azote, qui entre dans la composition de nombreuses molécules organiques. Bien que la forme d'azote la plus abondante soit le diazote (N_2) contenu dans l'atmosphère, celui-ci est chimiquement inerte et inutilisable par la majorité des organismes. La plupart des autotrophes (en particulier, les Plantes vertes) utilisent des formes combinées de cet élément : nitrates, nitrites ou bien ammoniaque ; les composés réduits plus complexes produits par les Végétaux (les acides aminés, par exemple) sont directement utilisés par les Animaux. Tous les êtres vivants, au cours de leur vie et après leur mort, restituent l'azote au milieu sous forme de NH_3 (**ammonification**). Des micro-organismes du sol, très répandus et très actifs, réoxydent ensuite ce dernier pour en tirer de l'énergie dans le cadre de la **nitrification** (processus aérobie), en produisant

des nitrites puis des nitrates. De nombreux groupes de Procaryotes libres, ou vivant en symbiose avec les Végétaux supérieurs : les Cyanobactéries, certaines Clostridies, les *Rhizobium*, certains Actinomycètes…, sont capables de fixer le N_2 atmosphérique, de le réduire et ainsi de l'injecter dans le cycle précédent ; on considère que 100 à 200 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont ainsi fixées annuellement (soit environ 1 % de la masse d'azote qui tourne dans le cycle). D'autres micro-organismes enfin participent à ce cycle en faisant l'opération exactement inverse, c'est-à-dire en transformant les nitrates en N_2 (**dénitrification**), après utilisation anaérobie des premiers comme accepteurs d'électrons.

On connaît depuis 1977 des écosystèmes basés sur un principe totalement différent de ceux connus à la surface de la planète (dans lesquels l'énergie solaire est le moteur initial), et qui fonctionnent à partir de chimiosynthèses. Il s'agit des communautés bactériennes et animales associées aux évents sous-marins (sources hydrothermales ou « fumeurs noirs ») que l'on trouve au niveau des dorsales océaniques, à plusieurs kilomètres de profondeur. Ces systèmes originaux vivent dans une obscurité totale et tirent leur énergie primaire de réactions d'oxydoréduction effectuées par des bactéries sulfo-oxydantes utilisant H_2S, contenu dans l'eau émise par ces sources, comme seul donneur d'électrons. La fixation chimio-autotrophique du CO_2 dissous par des Bactéries endosymbiotiques permet à des Animaux de grande taille, Vers du groupe des Pogonophores, Annélides, Mollusques, Crustacés, de vivre en parfaite autarcie et d'alimenter une chaîne trophique efficace produisant une abondante biomasse. La vie peut donc naturellement exister et se maintenir sans lumière, contrairement à ce qu'on a cru pendant longtemps.

Pour être complète, cette étude devrait aussi parler des cycles du soufre et du phosphore, que l'on a signalés dans la matière organique, ainsi que ceux du fer ou du manganèse… Tous mettent en jeu des micro-organismes particuliers (procaryotiques en général, mais aussi eucaryotiques : Algues et Champignons) et l'on mesure ainsi leur importance capitale dans l'économie du monde vivant. Bien que la connaissance des communautés microbiennes, en particulier dans le sol et les eaux, constitue déjà un volet important de la microbiologie, il semble qu'elle soit appelée, avec les avancées technologiques de la biologie moléculaire, à des développements considérables dans les décennies à venir. On estime en effet que plus de la moitié des espèces vivantes sont encore inconnues, la plupart d'entre elles étant des Bactéries !

4. OBJECTIFS ET PLACE DE LA BIOLOGIE CELLULAIRE DANS L'ENSEMBLE DE LA BIOLOGIE

4.1. Objectifs de la biologie cellulaire

La biologie cellulaire est une science relativement jeune, car elle date d'environ 150 ans ; elle s'est affirmée comme discipline à part entière seulement après l'énoncé de la **théorie cellulaire**, en 1838 (voir chapitre 2). Son objectif initial était de décrire avec un maximum de précision toutes les structures caractéristiques des cellules animales, végétales ou des êtres unicellulaires, leurs modifications au cours de la vie des cellules, la diversité de celles-ci au sein des organismes ou au cours du développement embryonnaire…

Il est rapidement apparu, aux yeux de ceux qui avaient une approche plus globale, à l'échelle des organismes, que la solution de tout problème biologique se trouverait finalement à l'échelle cellulaire. Qu'il s'agisse des fonctions digestive, nerveuse, musculaire ou respiratoire…, il devenait de plus en plus évident que la connaissance des propriétés d'absorption spécifiques des entérocytes, de conduction électrique de la membrane des neurones, de contraction des fibres musculaires, de transport de l'oxygène par les hématies…, était indispensable. De même, en physiologie végétale, les phénomènes d'absorption racinaire, de transport de l'eau, d'assimilation du carbone, ne pouvaient être compris en dehors de l'élucidation des questions de perméabilité cellulaire, d'osmose, d'oxydations cellulaires ou de photosynthèse par les tissus chlorophylliens. La génétique, la biologie du développement, démontrèrent aussi que les phénomènes fondamentaux de la vie se situaient au niveau cellulaire : prolifération cellulaire, gamétogenèse, fécondation, différenciation…

La biologie cellulaire s'est rapidement trouvée au cœur de la biologie, à la fois point de convergence et fondement de toutes les approches : seule l'étude des propriétés des cellules individuelles

permettrait de comprendre le fonctionnement et la construction des édifices pluricellulaires. De descriptive, la biologie cellulaire est devenue expérimentale et son objet est désormais la compréhension des structures et des mécanismes au niveau moléculaire. Ses principaux sujets d'étude sont actuellement : le trafic membranaire au sein de la cellule, le cytosquelette, la biogenèse des organites dits semi-autonomes, les fonctions des matrices extracellulaires et la signalisation membranaire. Science intégrative et pluridisciplinaire, la biologie cellulaire supprime les frontières entre diverses approches et fournit une vision plus complète des structures et des fonctions cellulaires : elle identifie les molécules constitutives des organites, elle replace les enzymes dans les compartiments, elle étudie les relations physiologiques qui existent entre eux et mesure enfin les flux métaboliques et énergétiques dans les conditions physicochimiques rencontrées *in vivo*.

4.2. Grandes étapes de la biologie cellulaire. Rapports avec les autres disciplines biologiques

Tout au long de son histoire, la biologie cellulaire a connu des progrès constants grâce à deux types d'événements :

– le développement d'instruments d'optique de plus en plus résolutifs et puissants, le dernier en date étant le microscope électronique, qui a permis de faire sauter un verrou capital dans le domaine des observations cellulaires ;
– la convergence de diverses approches développées initialement de manière indépendante, telles que la génétique, la physiologie, la biochimie et, plus récemment, la biologie moléculaire.

L'encart suivant donne quelques dates clefs jalonnant l'histoire de la discipline.

4.2.1. Évolutions parallèles de la biochimie et de la cytologie

L'identification des molécules constitutives des êtres vivants s'est faite initialement dans le cadre d'une branche de la chimie organique qui est devenue la chimie biologique ou **biochimie**. L'histoire de cette discipline remonte au milieu du XVIII[e] siècle, quand la chimie elle-même commence à prendre forme ; un siècle s'est écoulé entre les travaux des premiers cytologistes (voir chapitre 2) et ceux des pionniers de la chimie des êtres

ENCART HISTORIQUE

Les grandes étapes de la biologie cellulaire

• Description des structures cellulaires ; le développement de la microscopie photonique

1665-1820 : lente accumulation d'observations sur l'organisation cellulaire et tissulaire, principalement dans le domaine végétal et chez les Protistes.

1824-1839 : formulation de la **théorie cellulaire** (Dutrochet ; Schleiden et Schwann).

1855 : formulation de la **théorie sur la continuité cellulaire** (Virchow).

1830-1900 : description des principales structures et organites cellulaires ; mise au point des techniques de la cytologie et de l'histologie classiques. La biologie cellulaire se fonde comme discipline.

• Premières approches biochimiques et fonctionnelles *in vitro* ou *in situ*

1897 : préparation d'extraits acellulaires de levures permettant la fermentation et ouvrant ainsi la voie à une approche biochimique analytique du processus (Buchner).

1920 : premiers développements des techniques cytochimiques et cytoenzymologiques.

1924 : mise au point de la réaction «nucléale» de Feulgen (détection de l'ADN) ; détection du polonium sur des coupes de tissus animaux par Lacassagne (invention de l'autoradiographie).

1935-1940 : développement des méthodes utilisant les isotopes pour l'analyse du métabolisme.

1936-1939 : invention de la cytophotométrie en UV (détection des acides nucléiques ; Casperson) ; mise au point d'un test permettant de localiser de façon différentielle l'ADN et l'ARN grâce à des enzymes (Brachet).

1938-1950 : développement des techniques de fractionnement cellulaire et de purification d'organites (Claude, Brachet).

1950-1955 : préparation d'extraits acellulaires spécifiques assurant des fonctions biologiques complexes : contraction de myofibrilles isolées, battement des cils, synthèse protéique…

• Révolution du microscope électronique et description des ultrastructures

1931-1940 : mise au point du microscope électronique à transmission (Ruska) ; la première image d'une cellule paraît en 1945 (Porter).

1938 : invention du microscope électronique à balayage (VON ARDENNE), dont la commercialisation n'aura lieu qu'en 1965.

1944 : mise au point de la technique d'ombrage métallique.

1948-1956 : mise au point et développement des techniques d'ultramicrotomie, de fixation et d'inclusion en résine appliquées à l'analyse des ultrastructures.

1955-1959 : invention et développement de la technique de coloration négative.

1955-1966 : découverte et développement des techniques de cryofracture et de cryodécapage. La méthode de cryodécapage profond est mise au point en 1979.

• Approche moléculaire et renouveau des analyses structurales : le lien ultime entre structures et fonctions

1941 : mise au point des techniques de marquage des anticorps par greffage de fluorochromes : immunofluorescence (premiers développements des sondes protéiques).

1959 : utilisation d'anticorps couplés à la ferritine pour l'immunocytochimie en microscopie électronique.

1969 : mise au point de la technique d'hybridation *in situ* : développement des sondes nucléiques (GALL et PARDUE).

1975 : invention des hybridomes et production d'anticorps monoclonaux (KÖHLER et MILSTEIN).

1981 : mise au point des systèmes de renforcement d'images (vidéo-amplification) associés à un traitement électronique du signal, permettant de «voir», par exemple, des microtubules isolés, *in vivo*, en train de fonctionner.

1987 : redécouverte et développement du microscope confocal inventé en 1961 par MINSKI, mais tombé dans l'oubli.

1992 : mise au point de la méthode de visualisation des protéines grâce à la GFP.

vivants. Il est intéressant de comparer brièvement les dates clefs qui jalonnent la biochimie, discipline réductionniste par excellence, à celles qui jalonnent l'analyse descriptive des cellules.

C'est entre 1770 et 1786 que K. SCHEELE isole et purifie pour la première fois divers composés organiques, tirés de tissus animaux ou végétaux, tels que les acides citrique, malique, lactique, tartrique, urique… ou bien le glycérol et certains de ses esters. À la même époque, J. PRIESTLEY puis A. DE LAVOISIER étudient les oxydations biologiques, qui consomment O_2 et produisent CO_2 (respiration), comme n'importe quelle combustion. Le premier acide aminé isolé est l'asparagine (1806) ; un nombre croissant de substances organiques sont identifiées à la fin du XIXe siècle et au début du XXe.

En 1828, au moment où le microscope est considérablement perfectionné, ce qui ouvre la voie à une analyse structurale approfondie, le chimiste F. WÖHLER synthétise par hasard le premier composé organique à partir de composés minéraux : l'urée (isolée à partir de l'urine en 1773). L'acide acétique est l'objet d'une synthèse totale en 1844, et la décennie qui suit est marquée par celle de nombreux autres composés organiques (M. BERTHELOT). Ces expériences décisives annoncent la fin du vitalisme, doctrine très ancienne selon laquelle les composés organiques pourraient seulement être synthétisés par les êtres vivants, sous l'action d'une hypothétique force vitale, qui leur serait spécifique. Rappelons qu'au début de cette période, soit dix ans avant l'énoncé de la théorie cellulaire, aucune structure n'était encore connue dans les cellules, pas même le noyau !

L'étude et la caractérisation des macromolécules commencent par la découverte des propriétés des enzymes : l'amylase de blé est purifiée en 1833 par PAYEN et PERSOZ. Le glycogène est isolé en 1850, l'ADN en 1869, et l'ovalbumine est la première protéine cristallisée, en 1890. À la même période, la nature chimique des lipides est décrite. L'idée que les enzymes sont des catalyseurs biologiques et que toute la chimie des cellules repose sur elles est énoncée en 1893 (OSTWALD) ; les premières hypothèses sur l'organisation générale des protéines et leur mode d'action sont formulées entre 1894 et 1902 (E. FISCHER). Le terme de biochimie est créé en 1903 ; la fin du XIXe siècle voit donc simultanément la description de la plupart des structures cellulaires et l'identification des principales espèces moléculaires constituant les êtres vivants.

Pendant plus d'un siècle, la cytologie et la biochimie ont évolué parallèlement et connu une progression fulgurante, conduisant à un renouvellement complet des idées en biologie. Les biochimistes, en particulier, ont déchiffré peu à peu le métabolisme intermédiaire et le métabolisme énergétique : la fermentation, les grandes étapes et les mécanismes fondamentaux de la respiration cellu-

laire commencent à être identifiés. Il faudra cependant attendre la rencontre de ces deux approches pour que vienne la connaissance chimique des structures cellulaires individuelles. Mis à part quelques rencontres ponctuelles (telles la réaction cytochimique de FEULGEN ; voir chapitres 3 et 8), le réel point de convergence se situe vers 1935, lorsque les techniques d'homogénéisation tissulaire et de purification d'organites sont mises au point, bénéficiant des progrès de l'ultracentrifugation. Ces méthodes ouvrent la voie à des analyses biochimiques et physiologiques fines, à l'échelle subcellulaire. C'est à partir de cette époque également que la mise en œuvre des techniques de cytoenzymologie (voir chapitre 3) permet de détecter des activités cellulaires *in situ*.

4.2.2. EXPLOSION DE LA BIOLOGIE CELLULAIRE : LE MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE ET LES TECHNIQUES DE LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Les progrès du fractionnement cellulaire, au début des années 40, dus à A. CLAUDE et son école, jettent un pont entre les études morphologiques et biochimiques ou physiologiques développées jusque-là. Bien que réductrice, cette approche est tout à fait typique de la biologie cellulaire, car elle vise à décomposer les cellules en leurs structures élémentaires ou leurs organites, de telle sorte qu'ils conservent au maximum leur intégrité physiologique. Elle précède de quelques années seulement la mise au point du microscope électronique et des techniques histologiques associées. L'utilisation des radio-isotopes comme traceurs des activités chimiques des cellules représente une des retombées pacifiques des études sur l'énergie atomique ; ses débuts correspondent à la fin de la Seconde Guerre mondiale et son importance générale (fondamentale ou appliquée) en biologie a été, et reste encore, inestimable.

La rencontre de ces trois types de techniques, qui seront décrites en détail dans les chapitres suivants, constitue un «cocktail explosif» qui va révolutionner l'approche de la cellule dans la décennie suivante. Grâce aux progrès simultanés de la biochimie et de la biophysique, la structure intime et le fonctionnement des macromolécules (insuline, myoglobine, ADN…) ou des édifices supramoléculaires sont élucidés. La compréhension des mécanismes physiologiques à l'échelle des molécules et des ultrastructures est enfin possible et la vision de la cellule devient dynamique ; l'ère de la biologie cellulaire moderne est ouverte.

4.2.3. DERNIERS PROGRÈS : LA RENCONTRE AVEC LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Depuis une trentaine d'années, la biologie cellulaire a complètement changé de visage avec l'irruption de la biologie moléculaire ; les préoccupations traditionnelles de la biologie des cellules eucaryotiques étaient, jusque-là, surtout structurales et physiologiques. Par ailleurs, les connaissances sur la structure et le fonctionnement des gènes avaient été obtenues avec les méthodes de la génétique moléculaire (à partir des années 60) et s'appliquaient au seul monde des Bactéries. La fin des années 70 a enfin vu, avec le développement du génie génétique, le décryptage du génome eucaryotique : l'organisation particulière des gènes eucaryotiques, leur fonctionnement, leur mode de régulation ont été successivement décrits et leur intégration complexe dans des processus embryonnaires commence à être comprise.

On a alors assisté à la convergence vers une même problématique, de disciplines considérées jusque-là comme distinctes, voire éloignées : la physiologie (animale ou végétale), la génétique, la biochimie et la biologie du développement. L'unification de leurs méthodes expérimentales, de leur vocabulaire et de leurs concepts, parfois de leur matériel d'étude, a conduit à construire une biologie cellulaire résolument moléculaire et posant désormais toutes ses questions en termes de protéines spécifiques. Toute fonction cellulaire peut être analysée au niveau le plus primaire qui soit : en effet, qu'il s'agisse de la dynamique du cytosquelette, du transport de vésicules intracellulaires, des transferts ioniques à travers la membrane plasmique, des mécanismes de transduction des signaux hormonaux…, on trouvera toujours des protéines à la base de chaque phénomène.

Il est actuellement possible d'accéder à la connaissance de n'importe quel gène, pour peu que l'on dispose de quelques microgrammes de la protéine correspondante purifiée : on peut alors le cloner, le séquencer, le modifier *in vitro* et même le réintroduire dans le matériel génétique d'un organisme pour mieux comprendre son fonctionnement. La possibilité de passer d'un organisme à un autre, voire d'un règne à un autre, au niveau génétique (analyse transversale), constitue un des atouts majeurs de cette démarche. En conclusion, l'approche expérimentale moléculaire, qui pouvait sembler *a priori* la plus réductionniste de toutes, s'avère hautement intégrative, sans parler de son

impact de plus en plus considérable dans le domaine de l'évolution.

4.3. Outils et méthodes de la biologie cellulaire

La biologie cellulaire, aujourd'hui « science dure », s'est dotée d'instruments d'analyse de plus en plus puissants pour explorer les processus internes à la cellule. Bénéficiant des progrès techniques spécifiques d'autres disciplines, elle a néanmoins développé des méthodes et des outils qui lui appartiennent en propre ; ceux-ci sont traités en détail dans le chapitre 3. Elle utilise souvent de grands instruments d'analyse très sophistiqués et coûteux, dont seuls quelques grands centres peuvent disposer. À côté des classiques microscopes électroniques et des ultracentrifugeuses, on trouve désormais dans certains laboratoires des systèmes d'observation nouveaux : microscope confocal, systèmes de vidéoamplification et d'analyse d'image électronique, microscopes à champ proche…, ou bien des appareils permettant d'étudier simultanément et individuellement (cellule par cellule) plusieurs paramètres physiologiques dans des populations cellulaires complexes. Ces derniers permettent aussi de séparer et récolter des cellules vivantes appartenant à des catégories précises ainsi identifiées (cytométrie en flux et triage cellulaire). À la frontière avec la physicochimie, les apports de la méthode de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont considérables, tant dans la connaissance de la conformation des protéines et des édifices supramoléculaires (membranes), que dans celle des métabolismes *in vivo*.

RÉSUMÉ

La composition chimique globale des êtres vivants est très différente, du point de vue des proportions relatives, de celle du milieu minéral dans lequel ils vivent et d'où ils proviennent, au cours de l'histoire de la Terre. Divers critères permettent d'identifier sans ambiguïté les êtres vivants : organisation micro- et macroscopique complexe, activité métabolique et échanges avec le milieu, capacité de réponse vis-à-vis de différents stimuli, à tous les niveaux d'organisation, aptitude à se reproduire et surtout à évoluer.

Les molécules caractéristiques de la matière vivante sont classées en grandes catégories en fonction de leur taille, de leur nombre et de leurs fonctions, mais aussi en fonction de leur participation à la construction d'édifices plus ou moins complexes faisant insensiblement passer de l'échelle moléculaire à l'échelle cellulaire. Une propriété majeure des macromolécules biologiques est de former, par autoassemblage, des édifices de grande taille qui sont à la base de toutes les structures biologiques, internes ou externes. Les membranes, dont le rôle est fondamental dans toute cellule, résultent aussi de l'autoassemblage de phospholopides s'associant à des protéines spécifiques.

Le métabolisme est à la base de toutes les activités cellulaires consommant de l'énergie : activités chimiques, mécaniques ou osmotiques. Les êtres vivants peuvent être classés en grandes catégories, ou types trophiques, selon leur façon de prélever le carbone dans le milieu (autotrophes et hétérotrophes), leur source d'énergie primaire (énergie lumineuse ou chimique, contenue dans des molécules minérales ou organiques), et enfin le type d'accepteur d'électrons utilisé, molécule indispensable à toute oxydation.

Au sein de la biosphère, les êtres vivants s'organisent en chaînes trophiques permettant aux éléments atomiques qui les constituent de participer à des cycles de grande envergure : cycle du carbone, de l'azote, du soufre… ; l'énergie, quant à elle, fait l'objet d'un flux unidirectionnel à travers le monde vivant, dont le point de départ est le soleil.

La biologie cellulaire a pour objectif une approche intégrée des structures et du fonctionnement des cellules ; elle constitue aussi la base de toute connaissance des phénomènes à l'échelle des organismes. Uniquement descriptive à ses débuts, la biologie cellulaire a bénéficié, dans son histoire récente, des apports très importants de la biochimie et de la physiologie cellulaire ; le fractionnement cellulaire, combiné à l'utilisation de précurseurs radiomarqués, permet d'analyser directement les activités biologiques à l'échelle des organites.

Dès la fin des années 40, les apports révolutionnaires de la microscopie électronique ont permis

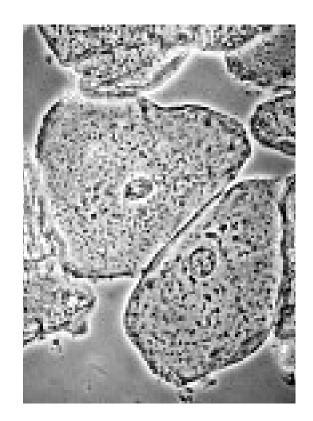
l'étude des ultrastructures et ont totalement renouvelé l'approche descriptive.

Enfin, la biologie moléculaire, née il y a environ 35 ans de l'étude des micro-organismes procaryotiques, est actuellement à l'origine de retombées considérables constituant une nouvelle révolution. L'analyse est désormais passée à un niveau moléculaire : n'importe quelle protéine peut être finement localisée dans une cellule et étudiée dans ses rapports avec les molécules voisines, aussi bien du point de vue structural que fonctionnel. La connaissance directe et rapide des gènes codant ces protéines ouvre en outre la voie à des manipulations insoupçonnées il y a encore peu de temps.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Qu'appelle-t-on «biosphère» et quels sont les 4 atomes les plus abondants que l'on y rencontre ?
2. Quels sont les quatre atomes les plus abondamment rencontrés dans les molécules organiques ?
3. Pourquoi le carbone est-il un atome chimiquement important dans la matière vivante ?
4. Citer les 4 caractéristiques fonctionnelles majeures permettant d'identifier un être vivant.
5. En quoi l'organisation microscopique est-elle un bon critère pour identifier les êtres vivants ?
6. Qu'appelle-t-on «métabolisme» ? quelles catégories de métabolisme distingue-t-on classiquement chez les êtres vivants ?
7. Définir l'homéostasie et en donner quelques exemples empruntés à la physiologie animale.
8. Quelle est l'espèce moléculaire la plus abondamment rencontrée dans la matière vivante ?
9. Rappeler les différents niveaux existant dans la hiérarchie des molécules caractéristiques de la matière vivante.
10. Avec quelles unités de mesure exprime-t-on les tailles des molécules, des cellules ?
11. Qu'est-ce qu'une «macromolécule» ? quelles sont les principales familles de macromolécules biologiques ?
12. Qu'appelle-t-on «auto-assemblage» ? donner quelques exemples d'édifices supramoléculaires issus de ce phénomène.
13. Quels arguments permettent d'affirmer que les Virus ne sont pas des êtres vivants ?
14. Quels grands groupes d'êtres vivants distingue-t-on sur la base de leur organisation cellulaire ?
15. Quels besoins essentiels des êtres vivants doivent être remplis pour qu'ils puissent assurer leur activité chimique ?
16. Qu'appelle-t-on «type trophique» ?
17. Après avoir défini les termes suivants : aérobie, anaérobie facultatif, anaérobie strict, donner un exemple d'organisme appartenant à chaque catégorie.
18. Donner les définitions de «organismes autotrophes» et «organismes hétérotrophes» ?
19. Quelle différence existe entre les organismes phototrophes et ceux dits chimiotrophes ?
20. Donner quelques exemples d'organismes chimiosynthétiques.



Chapitre 2

ORGANISATION CELLULAIRE

Il est banal aujourd'hui de dire que la **cellule** représente l'« unité de vie », l'élément fondamental de tout être vivant, simple ou complexe, bactérien, animal ou végétal. Cette affirmation repose actuellement sur deux évidences : 1) tous les êtres vivants connus existent sous une forme cellulaire et 2) toute cellule dérive par division d'une cellule préexistante. La notion moderne de cellule est relativement récente (150 ans), même si les premières observations de cellules remontent au XVIIe siècle. Il faut aussi se souvenir que la notion de génération spontanée, selon laquelle une cellule peut naître spontanément au sein d'une « humeur organique », comme un cristal dans une solution, abandonnée pour les cellules complexes dès 1855, restait encore en vigueur pour les Bactéries longtemps après cette date. Ce fut un des derniers sursauts du vitalisme, vigoureusement combattu par PASTEUR et TYNDALL.

Le concept de cellule, qui unifie le monde vivant, recouvre en fait une réalité plus complexe puisque deux plans d'organisation cellulaire existent, séparant le monde biologique actuel en deux grands groupes. Sur une simple base structurale, on distingue les **Procaryotes**, ou cellules à « noyau primitif », et les **Eucaryotes**, ou cellules « à noyau vrai », qui constituent les êtres pluricellulaires Animaux et Végétaux ainsi que les Champignons et les Protistes. De nombreuses caractéristiques, autres que celles relevant du noyau, permettent en fait de différencier ces deux groupes ; nous verrons aussi que cette dichotomie structurale ne reflète pas une réalité évolutive, comme le montre un nombre croissant d'études de biochimie et de biologie moléculaire.

Les cellules telles que nous les connaissons n'ont pas toujours existé sur notre planète. Au cours de l'histoire de la vie, qui dure depuis environ 4 milliards d'années, il s'est nécessairement trouvé une période initiale où des structures chimiques possédaient certaines propriétés attribuées à la vie sans qu'on puisse les qualifier d'êtres vivants et sans qu'une structure cellulaire classique puisse être reconnue. (Voir chapitre 16).

1. HISTORIQUE DE LA NOTION DE CELLULE

1.1. Premières observations. La théorie tissulaire

La découverte de l'organisation cellulaire de tous les êtres vivants est étroitement liée aux progrès des instruments d'optique. Le **microscope composé**, constitué de deux lentilles, a été mis au point à la fin du XVIe siècle (*figure* 2.1) ; son grossissement atteignait alors 150 à 200 fois. Son utilisation a permis à HOOKE de décrire (1665) pour la première fois l'organisation alvéolaire de fins copeaux de liège : il propose le mot « cellule » (du latin *cellula* : petite chambre), pour désigner les minuscules cavités géométriques qu'il découvre (il s'agit en fait de cellules végétales mortes, dont il a observé les parois). Ces structures sont ensuite observées dans de très nombreux autres tissus végétaux : MALPIGHI et GREW y décrivent, entre

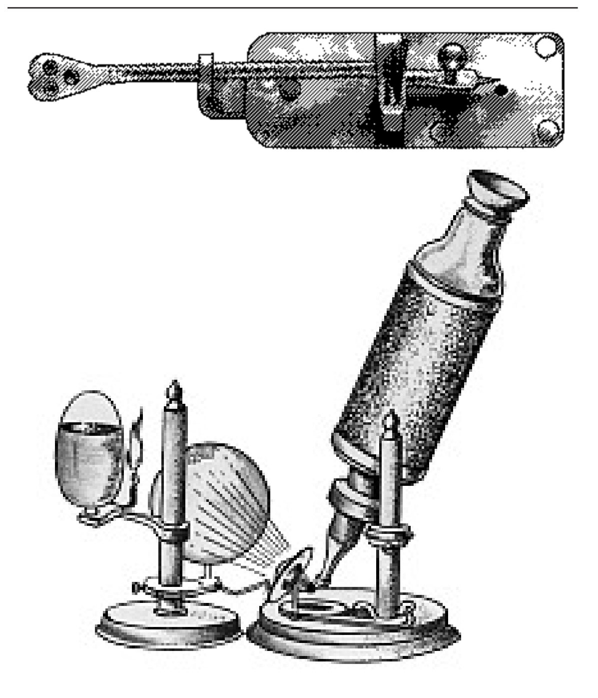
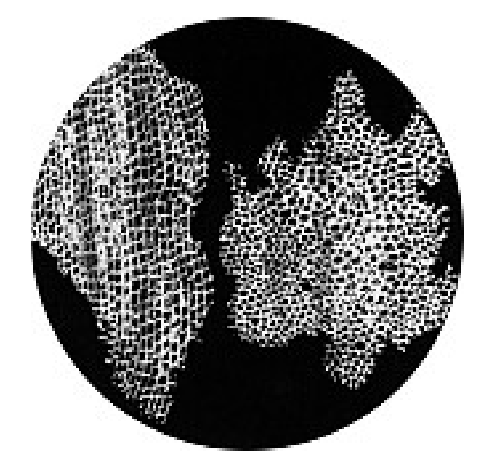
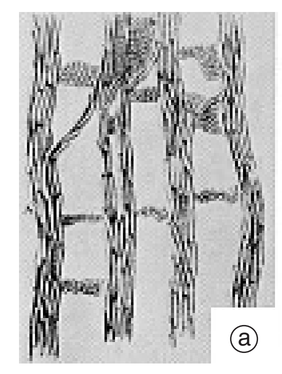


Figure 2.1

Microscopes utilisés par les premiers cytologistes

– En haut : microscope simple employé par A. LEEUWENHOEK, vers 1670. La minuscule loupe est incluse en haut de la plaque métallique rectangulaire ; la pointe portée par un double système de vis constitue le porte-objet.
– En bas : microscope composé utilisé par R. HOOKE, vers 1665. Noter le système d'éclairage des préparations à gauche de l'appareil (éclairage par dessus, et non pas en transmission).





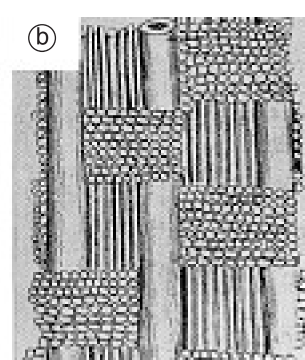


Figure 2.2

Premières observations de cellules végétales

– En haut : coupes longitudinale et transversale effectuées dans du liège et dessinées par HOOKE ; seules les parois des cellules mortes ont été observées.
– En bas : schémas de tissus végétaux effectués par M. MALPIGHI en 1675 **(a)** et 1687 **(b)**.

1670 et 1680, de nombreux « tubes et vésicules » ; ce sont les débuts de l'anatomie végétale (*figure* 2.2).

À partir de 1674, LEEUWENHOEK, au moyen d'une simple loupe (ou **microscope simple**), mais de qualité optique remarquable et bien supérieure à celle des microscopes composés de ses contemporains (grossissant près de 300 fois), décrit une multitude de micro-organismes vivants : Protistes et même Bactéries ! (*figure* 2.1). Au début du XIXe siècle, l'idée d'une organisation en **tissus** des organismes végétaux commence à se faire jour ; DUTROCHET réintroduit, en 1820, le terme de cellule, qui avait disparu depuis 150 ans.

1.2. La théorie cellulaire

Un progrès technologique important survient en 1827, lorsque AMICI apporte des corrections à la construction des microscopes composés et supprime les aberrations chromatiques, qui en limitaient beaucoup les possibilités. Une foule d'observations nouvelles s'en suit et, en 1833, BROWN décrit le noyau de cellules vivantes (dans des cellules d'orchidées) et l'interprète comme une structure cellulaire constante. Ces observations débouchent en 1838-1839 sur la formulation de la **théorie cellulaire**, élaborée par SCHLEIDEN et SCHWANN (respectivement anatomistes animal et végétal), selon laquelle tout être vivant complexe est constitué de cellules, qui représentent l'unité de base structurale et fonctionnelle de la vie. Cependant, ces auteurs imaginent encore que les cellules peuvent apparaître par génération spontanée, à la suite d'une coagulation de vésicules formées à partir d'un « liquide primordial », comme des « bulles dans le pain ».

Le concept de **protoplasme**, substance fondamentale vivante, est dégagé par DUJARDIN, chez les Protistes (1835), puis généralisé entre 1840 et 1845. En 1855, VIRCHOW démontre, par des observations

vitales, que toute cellule est issue d'une cellule préexistante (*omnis cellula e cellula*) ; la cellule est alors envisagée sous son aspect actuel.

1.3. Découverte des principaux organites des cellules eucaryotiques

Dans les années qui suivent, avec le développement des techniques histologiques (voir plus loin), et les perfectionnements considérables apportés au microscope composé par Abbe et Zeiss (1870-1885), les principales structures cellulaires sont décrites.

Tous les organites cellulaires, à l'exception des lysosomes et des peroxysomes, étaient identifiés dès la fin du XIXe siècle. Le microscope optique ayant atteint sa limite théorique de résolution, l'organisation précise de ces structures ne sera décrite qu'après la mise au point du microscope électronique (1931), dont le développement nécessitait de nouvelles avancées en physique. L'histoire du microscope photonique avait duré plus de 250 ans ! Il faut souligner, dans toute cette histoire, l'importance des biologistes végétaux, en raison des caractéristiques propres à leur matériel : cellules de grande taille, présence d'une paroi épaisse et d'organites colorés.

Encart historique

Découverte des principales structures cellulaires

1850 : distinction de la paroi et du protoplasme dans des zoospores d'algues, par Thuret.

1857 : découverte des mitochondries dans des cellules musculaires (Kolliker).

1875 : description des chromosomes par Strasburger et Flemming.

1877 : mise en évidence de la membrane plasmique (Pfeffer).

1880-1883 : analyse des plastes des cellules végétales (Schimper, Meyer).

1885 : découverte des propriétés osmotiques des vacuoles végétales (de Vries), identifiées dès 1844 par Naegeli.

1890-1897 : redécouverte des mitochondries par Altmann et Benda.

1897 : identification du réticulum endoplasmique (Garnier).

1898 : mise en évidence de l'appareil de Golgi.

2. OUTILS ET TECHNIQUES D'OBSERVATION DES CELLULES

2.1. Microscopes à transmission

En raison de la taille des objets étudiés, le biologiste cellulaire a, tout d'abord, besoin d'en obtenir une image agrandie de bonne qualité. Les microscopes dits à **transmission**, qu'ils soient photonique ou électronique, fournissent des images d'objets transparents, respectivement, à la lumière et aux faisceaux d'électrons. Cette condition impérative limite le type de cellules ou de tissus directement observables et, dans la plupart des cas, le matériel biologique devra être traité de façon appropriée pour pouvoir être analysé ; les techniques histologiques, décrites plus loin, répondent à la nécessité d'avoir des échantillons de très faible épaisseur.

2.1.1. Microscope photonique (ou à lumière)

Les notions d'optique géométrique ne seront pas revues ici, et seul le trajet des rayons lumineux sera rappelé, dans le cadre d'une comparaison avec celui des électrons au sein d'un microscope électronique. La partie optique d'un tel microscope est composée d'un premier système de lentilles appelé **objectif**, de très courte focale (donnant une image réelle agrandie de l'objet), et d'un deuxième système de lentilles appelé **oculaire**, qui donne une image virtuelle de cette dernière. L'image finale se forme au niveau de l'œil ou d'un appareil photographique associé au microscope.

La **puissance** d'un microscope est définie par le produit du grandissement de l'objectif par la puissance de l'oculaire. Cette notion importante doit être complétée par celle de **pouvoir séparateur**, qui détermine la qualité optique réelle de l'appareil ; on rappelle que la simple loupe de Leeuwenhoek grossissait à peine plus que le microscope composé de Hooke, mais qu'elle avait un bien meilleur pouvoir séparateur. Celui-ci est défini comme la distance minimale séparant deux points du plan objet dont le microscope donne des images distinctes ; sa valeur (d) est donnée par la formule :

$$d = \frac{0{,}6\,\lambda}{n.\sin\alpha}$$

λ = longueur d'onde de la lumière utilisée (0,4 à 0,8 µm, si lumière naturelle) ;

n = indice de réfraction du milieu situé entre l'objet et la lentille objectif ;

α = demi-angle d'ouverture de l'objectif.

On appelle le produit $n.\sin \alpha$: **ouverture numérique** de la lentille.

La valeur de d devant être aussi faible que possible, il faut donc diminuer au maximum λ et augmenter l'ouverture numérique. Ceci se fait en sélectionnant dans la lumière blanche naturelle des longueurs d'onde proches du violet, grâce à un filtre approprié. On peut aussi utiliser la lumière ultraviolette mais l'observation directe n'est pas possible (nécessité de clichés), et cela implique de coûteuses optiques en quartz, seules transparentes à ces rayonnements. L'ouverture numérique peut être significativement augmentée en remplaçant l'air (n = 1) entre la lentille et l'objet (cas des objectifs habituels) par une huile transparente dont l'indice de réfraction est élevé (n = 1,52) ; on parle alors d'observation à l'**immersion** et d'huile à immersion (voir *figure* 2.3). Dans les meilleures conditions, le pouvoir séparateur du microscope photonique atteint sa limite théorique, qui est comprise entre 0,2 et 0,3 µm.

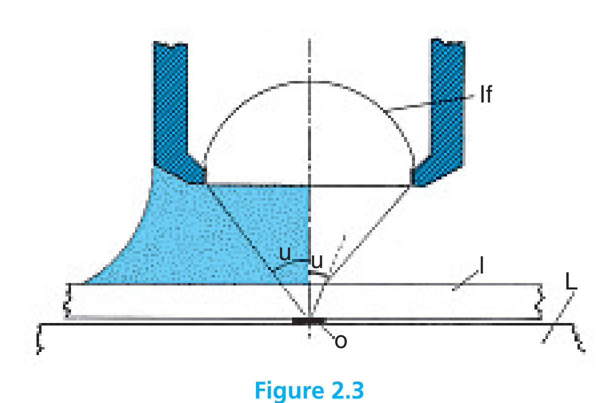


Figure 2.3

Coupe d'un objectif à immersion utilisé avec huile (partie gauche) ou sans huile (partie droite)

Cette coupe montre la différence des trajets suivis par les rayons lumineux dans les deux cas. L'utilisation d'huile contribue à augmenter significativement l'angle d'ouverture u depuis le point appartenant à l'objet observé (o), situé sous la lamelle (l). lf : lentille frontale ; L : lame.

La notion classique de **profondeur de champ** s'applique à l'observation microscopique : l'observateur n'a une vision nette, le long de l'axe optique, que sur une certaine épaisseur de l'objet. Pour ne pas obtenir une image brouillée et déformée par le fait que les rayons lumineux traversent des milieux hétérogènes au-dessus et en dessous de la zone nettement vue, il faut en principe observer des échantillons très minces. La profondeur de champ est d'autant plus faible que les objectifs utilisés sont plus puissants. Lorsqu'on a un objet transparent épais, on peut cependant avoir une vision assez correcte de ses structures internes en réalisant des **coupes optiques**, c'est-à-dire en faisant des mises au point successives et en réalisant des observations partielles (plan après plan) pouvant conduire finalement à une reconstitution dans l'espace. La mise au point récente du **microscope confocal**, permettant d'obtenir une observation sur un seul plan, même de très faible épaisseur, d'objets épais constitue un progrès considérable qui a été exploité en immunofluorescence ; son principe sera exposé dans le chapitre 11.

D'autres perfectionnements importants ont été apportés au microscope photonique au cours de ce siècle, tels le **contraste de phase** (Zernicke, 1932), le **contraste interférentiel** (Nomarski, 1952) et la **vidéoamplification** (1981).

2.I.2. Microscope électronique

Son principe est comparable à celui du microscope photonique, à la différence près que le faisceau de photons est remplacé par un faisceau d'électrons. La longueur d'onde associée à un faisceau d'électrons est d'autant plus courte que leur vitesse est plus élevée : lorsque ceux-ci sont accélérés sous vide sous une tension de 50 000 volts, celle-ci est de 0,005 nm, c'est-à-dire 10^5 fois plus courte que celle de la lumière visible moyenne ; cette longueur d'onde est beaucoup plus petite que la taille d'un atome d'hydrogène (voisine de 0,1 nm). La limite de résolution théorique d'un tel instrument est donc très inférieure à celle du microscope à lumière. Pour différentes causes techniques, le pouvoir séparateur obtenu n'est pas celui attendu, mais il atteint néanmoins 0,2 nm et est 1 000 fois plus élevé que pour le microscope classique. Les images obtenues peuvent être agrandies directement jusqu'à 500 000 fois, et bien plus avec l'agrandissement photographique.

Lorsque le faisceau incident d'électrons primaires traverse l'objet à analyser, ceux-ci sont absorbés ou réfléchis par certains de ses atomes et ils ne participent donc pas à la formation de l'image. Les atomes majeurs de la matière vivante

ENCART TECHNIQUE

Le microscope électronique à transmission (MET)

Ce gros appareil comprend essentiellement :

– une source d'électrons (filament métallique fortement chauffé sous vide : la cathode) accélérés sous une tension de 10 à 100 kvolts ;

– une enceinte tubulaire où est assuré un vide de 10^{-5} à 10^{-6} mmHg, grâce à de puissantes pompes ;

– une optique électronique constituée d'une série de lentilles (bobines) électromagnétiques et de diaphragmes, permettant de dévier et de contrôler la trajectoire des électrons ; une bobine condenseur focalise le faisceau sur l'objet à observer, puis une bobine déflectrice, fonctionnant comme un objectif, donne une image agrandie de l'objet et enfin une dernière lentille magnétique (le projecteur), équivalent d'un oculaire, agrandit l'image précédente. Le trajet des électrons est identique à celui suivi par les photons dans un microscope à lumière (voir *figure* 2.4). L'image finale, réelle, se forme sur un écran fluorescent, pour la vision à l'œil nu (ou mieux, à l'aide d'une loupe, pour voir les détails) ou sur une plaque photographique, après avoir escamoté l'écran (pour le travail sur cliché) ;

– un ensemble d'appareils et d'accessoires électroniques et informatiques permettant l'exploitation directe de l'image obtenue ou grâce à un circuit vidéo. L'enregistrement de l'image et son traitement sont ainsi assurés.

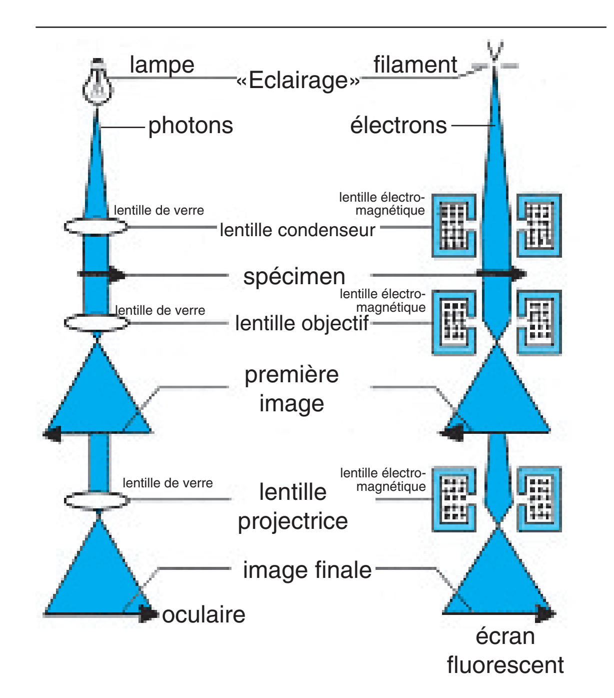


Figure 2.4

Schémas comparés des trajets des rayons lumineux et des électrons dans un microscope photonique et dans un microscope électronique

Le premier est équipé de lentilles de verre, tandis que le second est équipé de lentilles électromagnétiques.

(C, H, O, N) sont transparents aux électrons, d'où la nécessité de contraster les structures au moyen d'atomes lourds, opaques aux électrons, qui se fixent plus ou moins sélectivement à leur niveau. Le domaine explorable avec cet outil est celui des ultrastructures et même des molécules ; aux faibles grossissements (200 fois) il recoupe cependant le domaine du microscope précédent. Rappelons qu'il n'y a pas de couleurs visibles en microscopie électronique ; quand des clichés en montrent, il s'agit de fausses couleurs !

Les avantages considérables apportés par cet appareil (MET, en abrégé) ne doivent pas dissimuler plusieurs contraintes et limitations :

– un vide très poussé doit être maintenu dans la colonne afin que les électrons ne soient pas freinés et que leur trajectoire soit bien linéaire ; ceci implique que l'échantillon soit déshydraté (donc non vivant), pour ne pas être détruit ;

– en raison du faible pouvoir pénétrant des électrons, les objets observés doivent être extrêmement fins (coupes de 50 à 100 nm), ce qui nécessite des techniques spécifiques d'inclusion et de coupe des échantillons : un spécimen de 0,5 à 1 µm d'épaisseur apparaît presque totalement opaque à 50 kvolts ;

– sous l'action des électrons qui les traversent, les échantillons subissent une dégradation parfois rapide.

Les images obtenues avec cette technique d'observation de coupes en transmission ne sont que le reflet très incomplet des objets étudiés. En effet, la troisième dimension et la notion de volume disparaissent totalement. Dans une cellule de 20 µm de diamètre, on peut débiter 200 à 400 coupes ultrafines, qui ne pourront pas toutes être aisément recueillies et analysées. La technique dite des **coupes sériées**, classique en cytologie photonique, peut s'appliquer exceptionnellement ici, dans le cas de cellules de petite taille ou pour l'étude d'un

territoire cellulaire précis ; l'utilisation de microscopes à très haute tension permet aussi de pallier cet inconvénient (voir plus loin).

Outre les coupes, le MET permet d'observer des **répliques** (moulages métalliques) obtenues dans le cadre de la technique de **cryofracture** (voir chapitre 5), des préparations de molécules, ombrées de la même façon, ou bien des préparations de type **coloration négative** (voir chapitre 3).

2.2. Microscope photonique à épifluorescence

Cet appareil permet d'analyser la lumière réémise par fluorescence par un échantillon éclairé au moyen d'une lumière de longueur d'onde appropriée. Les molécules fluorescentes ont la propriété, lorsqu'elles sont éclairées par une lumière d'une certaine longueur d'onde (qu'elles absorbent), de réémettre une lumière de longueur d'onde plus élevée (et moins énergétique). De nombreux composés organiques sont naturellement fluorescents (la chlorophylle, par exemple), mais on utilise surtout en biologie des composés artificiels servant soit de marqueurs pour détecter des macromolécules, auxquelles on les a artificiellement associés (pour l'immunofluorescence, par exemple), soit de substrats dans des réactions enzymatiques (cytoenzymologie).

Tout composé fluorescent est caractérisé par une longueur d'onde précise d'excitation maximale et une longueur d'onde de réémission maximale ; la fluorescéine, par exemple, a un pic d'absorption situé entre 450 et 490 nm (bleu) et un pic d'émission situé entre 520 et 560 nm (jaune-vert). Un microscope à fluorescence est donc équipé d'une puissante source lumineuse éclairant le plus souvent dans l'ultraviolet (auquel de nombreux colorants de ce genre sont sensibles) et de filtres qui sélectionnent les longueurs d'onde appropriées de la lumière avant (excitation) et après (émission) que l'objet ait été éclairé. Ceci est nécessaire pour que l'image donnée par la lumière émise ne soit pas polluée par la lumière excitatrice.

Le microscope généralement utilisé, dit à **épifluorescence**, n'est pas un microscope à transmission ordinaire car la lumière reçue par l'œil ne traverse pas l'échantillon observé. En fait, les lumières excitatrice et réémise passent toutes deux à travers l'objectif et l'objet étudié est éclairé par dessus, d'où le nom d'épifluorescence. De nombreux microscopes de ce type sont équipés d'un dispositif permettant la microscopie confocale.

2.3. Observations vitales

Il s'agit de l'observation d'un matériel vivant brut ; la nécessité d'utiliser des objets transparents limite beaucoup le nombre de cellules ou de tissus directement observables. Les cellules vivant à l'état isolé, comme les Bactéries ou les Protistes (Protozoaires, Algues unicellulaires), ou bien les cellules sanguines ou en culture, sont seules aisément analysables (technique du **frottis**). De la même façon, seules des assemblées cellulaires de faible épaisseur, comme certains épithéliums animaux ou végétaux (unistratifiés, ou présentant un petit nombre de couches de cellules) sont faciles à observer. Ces observations se font dans des conditions où les cellules restent vivantes un minimum de temps, ce qui implique la mise au point de milieux appropriés et de montages appelés **chambres de survie**. Les conditions d'alimentation des cellules, de température, d'oxygénation, de pH, doivent être bien contrôlées, et ce d'autant plus que la durée de l'observation se prolonge.

Une autre difficulté des observations vitales tient au fait que les cellules ont en général un contenu transparent et incolore, d'où l'impossibilité de distinguer les structures internes. Chez les Végétaux, les chloroplastes ou les chromoplastes sont naturellement colorés, ainsi que les vacuoles dans lesquelles des anthocyanes sont accumulées. Chez les Animaux, la situation est moins favorable, à l'exception de quelques cas de cellules pigmentaires (mélanocytes). Dans les milieux transparents incolores, les seules variations sont dues aux différences d'indice de réfraction des divers organites ou structures ; au sein du noyau, par exemple, le nucléole a l'aspect d'une sphère brillante, en raison d'une forte réfringence. Divers dispositifs physiques associés au microscope utilisent cette propriété pour améliorer la lisibilité des images, sans qu'il soit nécessaire de colorer les cellules (voir plus loin).

2.3.1. Colorants vitaux

De nombreuses techniques de coloration, dites **vitales**, ont été mises au point, permettant de visualiser pendant des périodes plus ou moins

longues, différentes structures cellulaires. On peut citer quelques exemples de tels colorants :

– le violet dahlia et le violet cristal se fixent plus particulièrement sur le noyau ;
– le vert janus B et le nitro-bleu de tétrazolium, composés fonctionnant comme indicateurs spécifiques d'oxydoréduction, permettent de colorer les mitochondries. Le principe d'une telle coloration est exposé dans un encart technique (voir chapitre 10) ; ces colorations sont sublétales, plutôt que vitales ;
– le rouge neutre permet de colorer efficacement les vacuoles des Protistes, des Champignons ou des Végétaux (voir *figure* 2.5). Ce composé de masse moléculaire élevée pénètre par endocytose puis est transféré et accumulé dans les vacuoles ; son innocuité est liée au fait qu'il est séquestré dans un compartiment physiologiquement marginal au sein de ces cellules. Cette caractéristique a permis des études de longue durée sur la différenciation des vacuoles dans les racines.

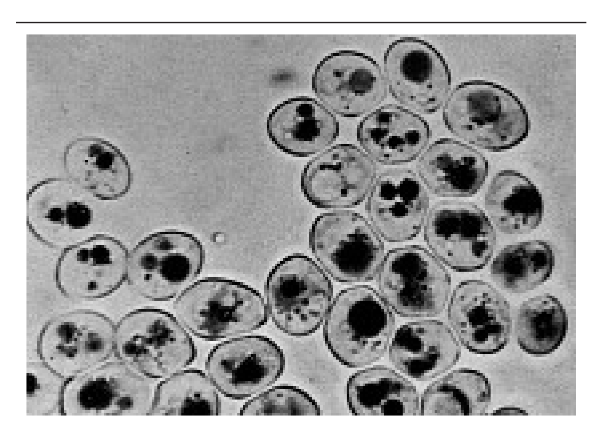


Figure 2.5
Coloration vitale des vacuoles de cellules de levure avec une solution de rouge neutre.
Ces cellules ont un diamètre de 5 à 10 µm.

Plusieurs composés de faible masse moléculaire, le plus souvent fluorescents, et ayant des propriétés de coloration vitale ont récemment été développés : les mitochondries, les plastes, les lysosomes, sont désormais aisément visualisés dans des cellules vivantes grâce à des **sondes d'activités métaboliques** (voir chapitre 3). On peut également considérer que des anticorps fluorescents injectés dans des cellules vivantes, qui reconnaissent des structures spécifiques sans perturber la physiologie cellulaire, font partie de ce groupe de **marqueurs** vitaux d'organites.

2.3.2. Dispositifs physiques

Ajoutés au microscope photonique classique, ces dispositifs permettent d'accentuer les légers contrastes existant entre les structures non colorées des cellules vivantes ou fixées et d'augmenter considérablement la qualité des observations.

• Le **microscope à contraste de phase** est basé sur le principe suivant : grâce à un système de canalisation de la lumière au moyen de deux diaphragmes annulaires situés respectivement dans le système d'éclairage et dans l'objectif, il est possible de transformer (en schématisant beaucoup) les différences d'indices des milieux traversés par la lumière en différences d'amplitude lumineuse. Ce système donne des images en nuances de gris là où la lumière naturelle ne permet aucune distinction ; il équipe tous les microscopes de recherche modernes (voir *figure* 2.6).

• Le **microscope interférentiel** est basé sur un principe différent et non présenté ici ; il fait, quant à lui, apparaître les structures cellulaires en relief.

• Le **microscope polarisant**, outil privilégié du minéralogiste, permet de déceler (grâce à la biréfringence) des structures possédant une organisation pseudocristalline dans les échantillons



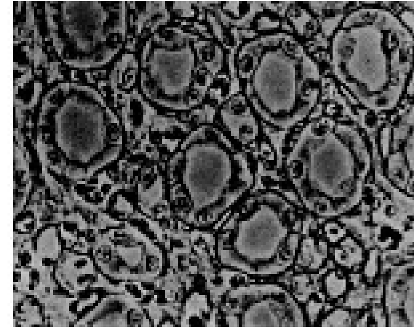


Figure 2.6
Comparaison des images obtenues avec un microscope photonique ordinaire (à gauche) et avec un microscope à contraste de phase (à droite)
Matériel non coloré artificiellement : coupes transversales de tubule rénal de Mammifère.

biologiques. On a ainsi mis en évidence des structures fibreuses orientées au sein d'édifices supramoléculaires tels les fuseaux de division (microtubules), les parois des cellules végétales (cellulose), les fibres musculaires striées (myofibrilles de myosine et d'actine), les grains d'amidon…

Ces dispositifs sont d'un intérêt considérable car ils autorisent l'observation de phénomènes vitaux de longue durée, tels que la division cellulaire, les mouvements cellulaires ou intracellulaires d'organites ou le développement embryonnaire précoce. Leur utilisation, combinée à celle du microcinéma, a apporté des informations capitales sur nombre de processus biologiques.

2.3.3. Limites de la technique

Malgré toutes ces améliorations techniques, l'observation vitale n'a que des possibilités limitées. Elle ne permet d'étudier que des cellules isolées, ce qui restreint beaucoup le champ d'analyse ; la fragilité des structures cellulaires est, dans de nombreux cas, très préjudiciable à des observations prolongées, dont la validité devient progressivement sujette à caution. Ce constat a conduit très tôt les biologistes à chercher les moyens de «figer» les structures cellulaires, en particulier celles des tissus massifs, afin d'en obtenir des sections fines et transparentes, aisément colorables et observables à loisir. L'origine de ces techniques remonte à la fin du siècle dernier ; leur ensemble constitue, pour la microscopie photonique, l'**histologie classique**, dans la mesure où elles ont d'abord permis l'analyse précise des tissus, avant celle des cellules.

2.4. Techniques de l'histologie classique et électronique

2.4.1. Histologie classique

Lorsque le matériel biologique est massif (tissus animaux ou végétaux : foie, cerveau, muscle…, ou tige, feuille, racine…), il faut préalablement le débiter en tranches fines et régulières, qui seront ensuite colorées. Ceci nécessite de nombreuses opérations avant d'arriver au stade de la **préparation microscopique**, telles que celles que l'on a l'habitude d'observer. Les étapes de ce protocole sont les suivantes.

• La **fixation** a pour but de tuer les cellules tout en modifiant le moins possible leurs structures internes. On utilise à cet effet des mélanges variés, empiriquement mis au point, contenant des substances connues pour dénaturer et coaguler essentiellement les protéines : acides, alcools, aldéhydes, certains sels… Ces fixateurs, dits coagulants, doivent être adaptés à la nature du matériel biologique analysé et au type de coloration employé ultérieurement ; il en existe un nombre considérable. Une fois la fixation achevée, le matériel doit être abondamment rincé à l'eau pour éliminer le fixateur qui pourrait détériorer la matière organique ou interférer avec les étapes suivantes.

• La **déshydratation** a pour but d'éliminer l'eau de l'échantillon et de la remplacer par un solvant du milieu utilisé pour l'inclusion ; elle consiste en une série de bains dans des alcools de plus en plus concentrés. Cette opération doit être progressive pour que la substitution n'entraîne pas de déformation des tissus. Un dernier bain est réalisé dans un mélange alcool/solvant organique du milieu d'inclusion, pour arriver enfin à avoir l'échantillon dans ce solvant pur : xylène, toluène…

• L'**inclusion** a pour objectif d'imprégner totalement les cellules d'une substance durcissante, qui permettra une coupe fine et régulière. Cette substance, dont les molécules remplacent en fait les molécules d'eau initiales, est souvent la paraffine qui est liquide à 60 °C et dure à la température ambiante ; soluble dans les solvants cités plus haut, elle pénètre très aisément dans les tissus. Après plusieurs bains à 60 °C et durcissement de la paraffine, on obtient un «bloc» qui pourra être correctement coupé et qui sert aussi de moyen de stockage des échantillons.

• La **coupe** a pour but de réaliser des sections fines (de 2 à 10 µm d'épaisseur) et transparentes de l'objet inclus. On utilise un **microtome**, muni d'un rasoir métallique et d'un système d'avance mécanique du porte-objet, qui donne des coupes sériées ; celles-ci sont collées avec une solution de gélatine sur des lames de verre, séchées et déparaffinées avec du xylène ou du toluène. Seule la matière organique de la coupe subsiste sur la lame.

• La **coloration** permet de teinter de façon différentielle les divers territoires de l'échantillon biologique. De très nombreuses colorations plus ou moins spécifiques ont été empiriquement mises au point vers la fin du XIXe et au début du XXe siècles (période prospère de la chimie organique des colorants). Tous ces colorants étant hydrosolubles (car

initialement destinés à la teinture des textiles), ils ne fonctionnent que si les coupes ont été réhydratées ; ceci nécessite l'emploi d'une série d'alcools de titres décroissants, pour arriver à l'eau.

• Le **montage** a pour but de rendre la préparation permanente, c'est-à-dire observable pendant des années. Après une déshydratation rapide de la préparation colorée, celle-ci est recouverte d'une goutte de résine naturelle ou synthétique, par dessus laquelle on dépose une lamelle de verre. Ce nouveau milieu transparent, dans lequel se trouve l'échantillon coloré, durcit par polymérisation.

La plupart de ces colorations sont de type «topographique». Elles mettent en évidence des structures, et non pas des composés précis, car les colorants employés fonctionnent comme des teintures, qui s'adsorbent plus ou moins efficacement sur leur cible, le plus souvent pour des raisons électrostatiques. C'est le cas de l'hématoxyline, de l'éosine, du carmin, du bleu de toluidine… D'autres semblent plus spécifiques, comme le vert de méthyle (qui colore la chromatine), ou la pyronine (qui met en évidence l'ARN nucléolaire et cytoplasmique). En histologie animale, les colorants sont souvent utilisés en mélanges tels que les classiques **trichromes,** qui autorisent des identifications tissulaires très précises. Certains sels, comme le nitrate d'argent ammoniacal, permettent aussi de visualiser des structures à la suite de la réduction de Ag^+ en Ag métallique par divers composés cellulaires ; on parle alors de coloration (ou **imprégnation**) argentique. L'acide osmique conduit à des résultats voisins.

Les techniques histologiques classiques ont permis, au cours du siècle écoulé, de décrire et de caractériser, par exemple, les quelque 200 types cellulaires dont sont constitués les Vertébrés supérieurs. Pour conclure, il faut dire qu'il existe, à côté de ces méthodes, des colorations renseignant l'observateur sur la nature chimique exacte des structures visualisées : il s'agit des techniques **cytochimiques**, exposées dans le chapitre 3.

2.4.2. Histologie électronique

La réalisation de coupes ultrafines adaptées à la microscopie électronique a nécessité l'apport de plusieurs modifications au protocole précédent, dont les grandes lignes restent conservées. Dans la mesure où les structures cellulaires doivent être ici parfaitement préservées, pratiquement jusqu'à un niveau moléculaire, la fixation et l'inclusion sont des opérations cruciales, dont la mise au point a été longue et difficile. De plus, la réalisation de coupes ultrafines a nécessité la fabrication d'ultramicrotomes très sophistiqués. L'observation des échantillons se fait après avoir introduit une grille porte-objet dans un sas du microscope, dans lequel on peut «casser» le vide localement, sans avoir à toucher au reste de la colonne. L'observation directe se fait sur un écran fluorescent situé dans l'axe du faisceau d'électrons.

Cette technique, qui a permis de décrire toutes les ultrastructures cellulaires désormais classiques, présente un inconvénient majeur dont les cytologistes n'ont pas pris conscience tout de suite : elle ne donne qu'une vision très partielle des cellules. En effet, si on réalise des coupes de 50 nm d'épaisseur dans une cellule de 20 µm de diamètre, on ne voit sur chacune d'elles qu'1/400e du volume cellulaire. Pour reconstituer les structures dans l'espace et retrouver la notion de volume, on peut procéder à la réalisation de coupes sériées, c'est-à-dire qu'on observe toutes les coupes réalisées ; ceci est particulièrement délicat et fastidieux en microscopie électronique et, de fait, n'a été mis en pratique qu'exceptionnellement.

Cette approche a pourtant été très instructive : on a ainsi constaté, par exemple, que les mitochondries, systématiquement décrites comme des globules ou des bâtonnets (en raison de l'aspect circulaire de leurs sections) pouvaient être constituées, dans certains tissus ou à certains moments de la vie de la cellule, par de très longs filaments sinueux et ramifiés. Le même type de remarque peut être fait pour tous les organites eucaryotiques d'une certaine taille et présentant une structure tridimensionnelle complexe, comme l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique.

Une manière plus directe de reconstituer les volumes cellulaires, en microscopie électronique, consiste à utiliser un microscope à très haut voltage (accélération des électrons sous plusieurs millions de volts). En permettant l'étude de coupes relativement épaisses (de l'ordre du µm), ou même de cellules entières fixées, cet appareil gigantesque (dont la colonne mesure plus de 10 m de haut) redonne accès à la troisième dimension et confirme les observations obtenues par les coupes sériées. Ce type d'appareil, très coûteux et donc peu répandu, nécessite cependant un savoir-faire certain pour produire et interpréter les images.

Encart technique

La technique histologique en microscopie électronique

1. Fixation

Les fixateurs classiques ne suffisent pas car ils tendent à coaguler les protéines et à détruire les structures fines. Il faut utiliser ici des agents chimiques qui réalisent des pontages entre les molécules voisines, plus qu'ils ne les dénaturent ; cette fixation « en douceur » stabilise les structures auxquelles elles appartiennent :

- le permanganate de potassium assure une excellente conservation des membranes lipoprotéiques, mais les structures cellulaires contenant des acides nucléiques sont très mal fixées ;
- le tétroxyde d'osmium se comporte comme le précédent, mais il pénètre mal dans les cellules ;
- le glutaraldéhyde pénètre bien dans les cellules, fixe efficacement de nombreuses structures, sauf les membranes.

De fait, on combine les avantages des différents fixateurs en réalisant une **double fixation** : un traitement au glutaraldéhyde suivi d'un traitement au tétroxyde d'osmium.

2. Inclusion en résine

Le principe est le même que pour l'histologie classique, à la différence près que la déshydratation préalable doit se terminer dans un solvant de la résine utilisée pour l'inclusion. Les milieux d'inclusion utilisés sont souvent des **résines** de la famille des araldites, qui polymérisent à chaud en présence d'un catalyseur. On obtient des petits blocs solides et très durs, incluant et imprégnant l'échantillon à analyser ; la dureté de ce matériel permet d'obtenir des coupes extrêmement fines et régulières. On utilise aussi des résines hydrosolubles pouvant être éliminées des coupes, ce qui autorise des expériences d'immunocytochimie en microscopie électronique.

3. Coupe : ultramicrotomie

Les coupes ultrafines sont réalisées grâce à des couteaux de verre ou de diamant très affutés. Le problème technique de l'avance régulière et surtout très progressive du porte-objet devant le couteau est résolu par la mise au point de systèmes basés, par exemple, sur la dilatation d'un axe métallique (avance thermique). Les coupes, de très faible taille (moins de 0,5 mm de côté) et très fines, sont invisibles à l'œil nu et difficilement manipulables sans l'aide d'une loupe. Le couteau est en fait muni d'une petite cuvette contenant de l'eau à la surface de laquelle les coupes flottent. Celles-ci sont récupérées sur des grilles de 3 à 4 mm de diamètre, à mailles très fines, qui servent en fait de porte-objet et seront introduites dans la colonne du microscope.

4. « Coloration »

Cette étape consiste en un simple renforcement des contrastes : on parle de « coloration positive ». Certains atomes de métaux lourds se fixent sélectivement sur diverses structures cellulaires, fixation qui arrête efficacement les électrons à leur niveau. Le résultat est un meilleur contraste des images. On utilise pour cela des solutions d'acétate d'uranyle ou de citrate de plomb et on fait flotter quelque temps les grilles portant les coupes sur des gouttes de ces substances.

2.5. Techniques d'observation des formes et des surfaces

2.5.1. Coloration négative et ombrage métallique

La coloration négative s'applique à des objets de très petites dimensions, de forme relativement simple (molécules, Virus ou éléments cellulaires isolés : organites ou fragments d'organites). Elle permet de voir, en microscopie électronique à transmission, de très fins détails que les coupes ne permettent pas de visualiser, en particulier dans le cas des structures fibreuses (protofilaments protéiques, flagelles, queue de certains Virus…). L'ombrage métallique s'applique aux mêmes objets, mais le principe est un peu différent et les images obtenues sont plus empâtées que dans le cas du protocole précédent. Il permet, en particulier, de visualiser de façon simple les molécules d'acides nucléiques. Il constitue également une étape dans le protocole de cryofracture ; ces deux techniques sont détaillées dans le chapitre 3.

2.5.2. Cryofracture

La cryofracture est une technique fondamentalement différente des deux précédentes, qui per-

met l'observation de tissus massifs, dont elle donne une vue interne qui n'est pas le résultat d'une coupe, mais celui d'une fracture. Les images obtenues sont, au départ, un peu déroutantes car très différentes de celles que donnent des coupes. La différence tient au fait que la fracture arrache des morceaux de cytoplasme, généralement en passant à travers les membranes cellulaires (voir encart détaillé dans le chapitre 5). Les organites sphériques apparaissent, suivant qu'ils ont été enlevés ou pas, comme des creux ou des bosses ; on reconnaît cependant aisément tous les organites et toutes les structures classiques.

Cette technique présente deux avantages considérables : 1) elle permet de travailler sur un matériel congelé dont la structure est aussi proche que possible de la structure native et 2) elle permet d'observer l'organisation superficielle des membranes cellulaires, ce que les coupes n'autorisent pas, sauf dans le cas (rare) de coupes tangentielles.

2.5.3. Microscopie à balayage

La microscopie à balayage est la technique privilégiée d'observation des surfaces. Grâce à sa profondeur de champ exceptionnelle, le microscope utilisé permet d'observer des préparations de grande taille, avec d'importants reliefs. La résolution est plus faible que celle du microscope à transmission classique (1 nm) ; les grossissements vont de 20 à 400 000, et la profondeur de champ peut atteindre plusieurs mm aux faibles grossissements. C'est cette technique qui permet d'obtenir des photos spectaculaires de cellules entières, d'organes végétaux et même d'Insectes de petite taille (voir *figure* 2.7). Les échantillons biologiques doivent en général être recouverts d'une couche de 5 à 10 nm d'or, de platine ou de palladium, afin de réfléchir les électrons.

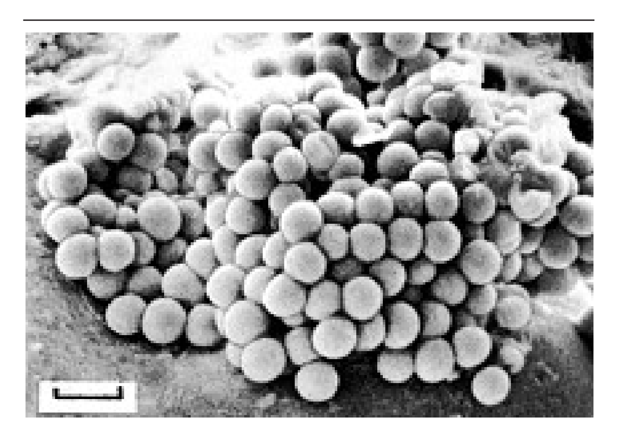


Figure 2.7

Colonie de *Staphylococcus aureus*

Colonie de cocci observée en microscopie à balayage ; cette bactérie est responsable d'infections respiratoires chez les sujets fragiles (barre = 2 µm). Cliché Labo, BG, Orsay.

3. PLANS D'ORGANISATION CELLULAIRE

Les premiers cytologistes ont d'abord été frappés, et émerveillés sans doute, par la diversité des formes, des tailles, des structures internes présentées par les cellules animales ou végétales, et dévoilées par leurs microscopes. La théorie cellulaire unifiait cependant cette diversité apparente et de fait, quelle que soit leur origine, toutes les cellules partageaient de nombreux caractères structuraux ; il a été vérifié, tout au long du XIXe siècle, que le monde animal et le monde végétal, qui se différenciaient pourtant par quelques traits spécifiques, possédaient le même plan d'organisation fondamental. Les Bactéries semblaient seulement se distinguer du reste du monde vivant par leur taille minuscule ; les difficultés d'observation, liées au fait que ces êtres avaient des dimensions voisines du pouvoir séparateur du microscope photonique, ne permettaient pas de décrire leur organisation précise. Il était alors admis implicitement que les Bactéries étaient des cellules classiques, mais « en miniature ».

À partir de 1950, l'avènement du microscope électronique a démontré qu'il n'en était rien et que les Bactéries, les Cyanobactéries (alors appelées Algues bleu-vert), ainsi que d'autres micro-organismes, possédaient un plan d'organisation bien plus simple et fondamentalement différent de celui des cellules connues jusque-là. Dès lors, le monde vivant fut découpé en deux grands groupes, sur la base de la structure cellulaire : les **Eucaryotes**, ou cellules à vrai noyau, et les **Procaryotes**, ou cellules à noyau primitif (ou sans noyau vrai). Ces termes avaient été forgés dès 1920 par E. Chatton pour traduire une différence que cet auteur jugeait capitale entre les deux groupes, idée qui ne fut acceptée que trente ans plus tard.

La biochimie et la biologie moléculaire montrent que ces deux types d'êtres vivants, si radicalement différents par leur architecture cellulaire, présentent cependant une grande similitude au

niveau des mécanismes fondamentaux touchant au métabolisme de base ou à la nature et l'expression du matériel génétique. Il est admis, pour cette raison, que tous les êtres vivants descendent d'un ancêtre commun, c'est-à-dire d'une cellule primitive présente sur la planète il y a près de 4 milliards d'années (voir chapitre 16). Comme on le verra, les données les plus récentes conduisent à subdiviser les Procaryotes en deux groupes différant plus par certaines caractéristiques biochimiques et moléculaires que par leur organisation, mais ces différences sont telles que ces deux nouveaux groupes semblent aussi éloignés évolutivement l'un de l'autre qu'ils le sont tous deux des Eucaryotes. Bien que les Procaryotes semblent plus primitifs d'organisation et soient évolutivement plus anciens, nous les examinerons après les Eucaryotes, qui nous sont plus familiers.

3.1. Plan d'organisation eucaryotique

Les Eucaryotes sont des êtres vivants unicellulaires ou pluricellulaires (la situation la plus courante), constitués de cellules de taille en général relativement grande, et possédant des caractères qui les distinguent radicalement des Procaryotes ; c'est parmi eux que l'on compte les organismes actuels les plus complexes. Les traits communs à tous les Eucaryotes seront examinés dans un premier temps ; les différents groupes qui les constituent et leurs spécificités structurales seront décrits séparément.

3.1.1. Caractéristiques générales des Eucaryotes

La taille moyenne des cellules eucaryotiques est comprise entre 10 et 100 µm, mais certaines peuvent être significativement plus grandes et atteindre des dimensions de l'ordre du cm (chez certaines Algues unicellulaires ou de nombreux œufs, chez les Animaux). En termes de volumes, ces cellules sont donc 1 000 à un million de fois plus grosses que les cellules procaryotiques ; la différence de complexité existant entre les deux groupes doit être directement mise en rapport avec cette simple observation, en raison des conséquences physiologiques qu'elle implique.

L'augmentation considérable du volume moyen pose des problèmes importants au niveau des échanges entre cellule et milieu, liés à la diminution relative de la surface cellulaire, celle-ci s'accroissant évidemment moins vite que le volume correspondant. La diversité des fonctions remplies par la seule membrane cytoplasmique des cellules procaryotiques : fonctions d'échange, rôle énergétique, etc., ne peut plus être assurée chez les Eucaryotes. Par ailleurs, l'augmentation de volume du cytoplasme tend à diminuer l'efficacité des réactions enzymatiques se déroulant en phase soluble ; la vitesse de ces réactions est en effet directement fonction des concentrations en enzymes et en substrats (qui évidemment varient en sens inverse du volume). La résolution de cette difficulté a sans doute conduit, au cours de l'évolution, à la sélection de dispositifs de compartimentation de l'espace cellulaire par des membranes. Tout en permettant une régionalisation du métabolisme, celles-ci, par le biais de leurs propres protéines constitutives, peuvent fonctionner comme des surfaces catalytiques et ainsi compenser l'augmentation de taille des cellules.

Les cellules eucaryotiques sont subdivisées en territoires limités par des membranes simples ou doubles, appelés **organites**, d'où une organisation interne d'une grande complexité. Ces territoires cytoplasmiques, ou **compartiments**, accomplissent des fonctions physiologiques spécialisées ; ils ne fonctionnent cependant pas d'une façon isolée et l'intégration très poussée de leurs activités est même une caractéristique de la vie. Parmi ces organites, le plus évident et le plus anciennement connu est le **noyau**, qui renferme l'essentiel du matériel génétique de la cellule. La séparation physique de l'information génétique du reste de la cellule a des conséquences importantes pour ce qui concerne son fonctionnement ; nous verrons que les deux étapes fondamentales de son expression (la transcription et la traduction) sont ainsi spatialement et donc temporellement dissociées.

D'autres organites bien délimités, tels que les **mitochondries** et les **plastes** (ces derniers chez les Végétaux et certains Protistes, seulement), sont bien visibles, et avaient été identifiés par les premiers cytologistes. Leur fonction est liée au métabolisme énergétique et aux conversions d'une forme d'énergie en une autre au sein de la cellule (respiration, photosynthèse). Des structures membranaires, souvent très développées, remplissent le cytoplasme ; il s'agit du **réticulum endoplasmique** et de l'**appareil de Golgi**, qui forment des sacs unimembranaires aplatis dont les fonctions sont essentiellement associées aux mécanismes de

sécrétion de protéines et de polysaccharides, ainsi qu'aux synthèses de lipides membranaires. Un grand nombre de structures vésiculaires de taille et de morphologie variées sont également rencontrées dans ces cellules : il s'agit des **lysosomes**, des **peroxysomes** et des **endosomes**, impliqués dans des processus de digestion intracellulaire ou de métabolisme oxydatif non générateur d'énergie. Un compartiment spécifique du monde végétal est représenté par la (ou les) **vacuole**(s), dont les fonctions sont également multiples.

Le **hyaloplasme** (ou cytosol), milieu dans lequel baignent les organites précédemment cités, est hautement structuré par un système de microtubules et de microfilaments, appelé **cytosquelette**, qui n'a pas d'équivalent chez les Procaryotes et représente une différence fondamentale entre les deux groupes. Celui-ci a une double fonction : il est responsable de l'architecture cellulaire d'une part, et des mouvements intracellulaires (affectant les organites ou les chromosomes, lors de la division) ou cellulaires (déplacement des cellules isolées), d'autre part. En rapport à la fois avec ces divers mouvements de grande ampleur et avec la richesse en structures membranaires internes qui les caractérise, on doit signaler l'existence, chez les Eucaryotes, des processus spécifiques d'**endocytose** et d'**exocytose**. Ces processus, qui impliquent l'intervention de vésicules, permettent des échanges de matière dans les deux sens entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. La capacité d'endocytose, et plus spécialement de phagocytose d'objets de grande taille, est sans doute fondamentalement à l'origine des cellules eucaryotiques modernes, dans le cadre de la théorie de l'**origine endosymbiotique des mitochondries et des plastes** (voir chapitre 16).

L'organisation du matériel génétique et les modalités de la division cellulaire chez les Eucaryotes sont fondamentalement différentes de celles des Procaryotes. Les premiers, dont l'information génétique est en moyenne 100 à 1 000 fois plus importante (en taille globale, mais pas en nombre de gènes) que celle des Procaryotes, possèdent des chromosomes linéaires, souvent en grand nombre, visibles seulement à des stades précis du cycle cellulaire. Après duplication conforme de l'information génétique qu'ils contiennent, la division cellulaire permet leur séparation en deux lots identiques et leur répartition dans deux cellules-filles grâce à un système d'une grande complexité ; il s'agit de l'appareil mitotique, une des composantes du cytosquelette, qui n'a pas d'équivalent chez les Bactéries.

La très grande majorité des Eucaryotes (on connaît quelques exceptions chez les Protistes) pratique le mode de reproduction sexuée, qui est caractérisé par l'existence d'un cycle de vie dans lequel existe une alternance de deux phases distinctes dites **haploïde** et **diploïde**. Ces phases sont séparées par deux événements compensateurs du point de vue du nombre de chromosomes et de la quantité d'information génétique nucléaire des cellules correspondantes : la fécondation et la méiose. Sans entrer dans les détails, on rappelle qu'un tel mode de reproduction favorise considérablement le brassage de l'information génétique, facteur certain d'évolution et d'accroissement de la complexité des organismes. La plupart des êtres pluricellulaires se développent à partir d'un œuf (zygote) diploïde ; ils présentent à l'état définitif (dit adulte, chez les Animaux) une différenciation plus ou moins marquée en cellules et tissus structuralement et physiologiquement adaptés à des fonctions précises (chapitre 14).

Les cellules eucaryotiques, qui ont la capacité à former des édifices pluricellulaires ordonnés, possèdent de nombreux mécanismes moléculaires de reconnaissance de leur surface, ainsi que divers dispositifs d'accrochage intercellulaire n'ayant évidemment pas cours chez les Procaryotes.

Les capacités métaboliques des Eucaryotes, c'est-à-dire leur aptitude générale à utiliser les sources de matière et à extraire l'énergie du milieu, sont beaucoup moins diversifiées que celles rencontrées dans l'ensemble des Procaryotes ; la respiration et la photosynthèse sont en effet les deux seuls «types métaboliques» retenus par la très grande majorité d'entre eux. La complexité structurale croissante de ces organismes au cours de l'évolution semble s'être faite au détriment de la diversité physiologique, réservée aux Procaryotes ; seuls quelques rares Protistes présentent des métabolismes atypiques par rapport à cette norme. Le sens d'une telle corrélation inverse, dans le cadre de deux stratégies évolutives bien différentes, n'est pas clair.

3.1.2. Cellules animales. Organismes animaux

L'organisation typique des cellules animales, telle que la décrit la microscopie optique, est illustrée dans la *figure* 2.8. La cellule hépatique de Vertébré (d'un diamètre voisin de 20 µm) peut être

retenue comme cellule type, dans la mesure où elle renferme tous les organites caractéristiques, de manière équilibrée, à la différence de certaines cellules différenciées, comme celles que nous évoquerons plus loin. Ce schéma devra évidemment être complété par les structures que seule la microscopie électronique permet d'observer : lysosomes, peroxysomes, endosomes, vésicules d'endocytose, ribosomes, centrioles…

Les cellules animales possèdent en outre plusieurs caractéristiques liées au fait qu'elles appartiennent à des organismes nécessairement pluricellulaires, où elles sont organisées en tissus, eux-mêmes assemblés en organes et appareils. Ces derniers assurent des fonctions physiologiques précises : digestion, respiration, locomotion, excrétion… Au sein de certains tissus, les cellules sont étroitement accrochées entre elles par des dispositifs cytologiquement identifiables, appelés **jonctions intercellulaires**, dont la fonction première est d'assurer une cohésion mécanique. Elles sont sans équivalent dans tous les autres groupes eucaryotiques. Certaines permettent une communication directe entre les cytoplasmes et autorisent le passage de petites molécules d'une cellule à l'autre.

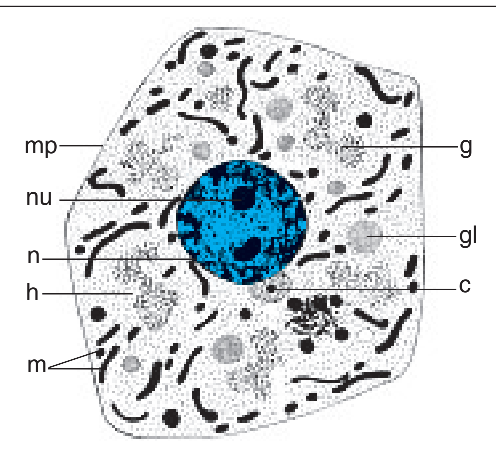


Figure 2.8

Schéma d'une coupe de cellule animale typique (hépatocyte de Mammifère), observée en microscopie photonique après coloration

Les principaux organites sont identifiés.
c : centrosome ; g : glycogène ; gl : gouttelette lipidique ; h : hyaloplasme ; m : mitochondries ; mp : membrane plasmique ; n : noyau ; nu : nucléole.

Dans d'autres tissus, les cellules ne sont pas jointives, et les espaces intercellulaires sont remplis d'une substance chimiquement complexe et hautement structurée résultant d'une sécrétion par des cellules spécialisées : il s'agit de la **matrice extracellulaire**. Longtemps considéré comme amorphe et inerte, ce composant qui est parfois majoritaire dans certains tissus remplit un grand nombre de fonctions inattendues (voir chapitre 14).

Les cellules animales présentent souvent des morphologies et des organisations internes complexes, en relation avec une fonction spécialisée ; on peut citer, par exemple, les cellules nerveuses (conduction à distance d'un signal électrique), les cellules musculaires (contraction), les cellules sécrétrices (production de substances extracellulaires), les cellules en bâtonnet de la rétine (réception d'un signal lumineux), les cellules épithéliales… (voir *figure* 2.9). Chez les Animaux les plus complexes, on recense jusqu'à 250 types cellulaires distincts, reconnaissables par leurs seuls traits structuraux. Ceci est évidemment en rapport avec le mode de vie typique de ces êtres, qui implique la mobilité et une vie de relation importante et, pour les plus évolués d'entre eux, une homéostasie rigoureuse du milieu intérieur.

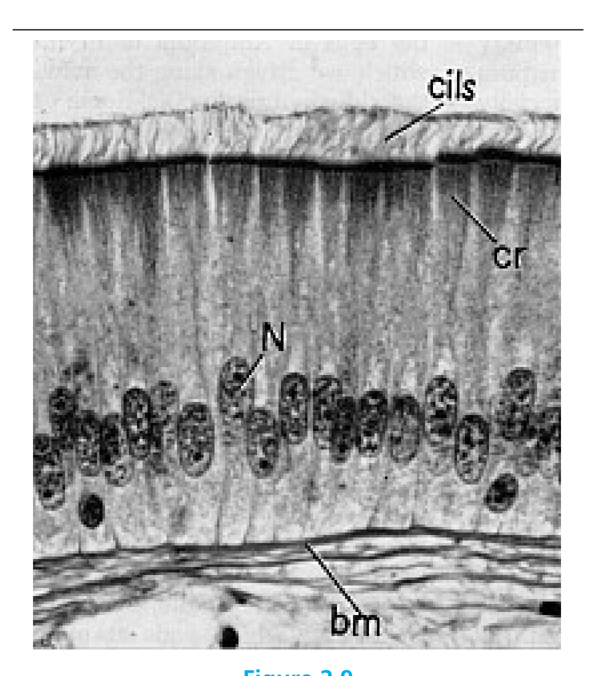


Figure 2.9

Épithélium intestinal de mollusque

Cet épithélium prismatique simple, à hautes cellules, porte des cils vibratiles ancrés dans le cytoplasme par de profondes racines ciliaires (cr). Il repose sur une fine lame basale (bm). Collection Labo. BG, Orsay.

3.1.3. Cellules végétales. Organismes végétaux

Les cellules des Végétaux diffèrent des cellules animales par une taille plus grande (50 à 250 µm),

et une forme généralement anguleuse et géométrique. Une cellule parenchymateuse de feuille de Végétal vert peut être retenue comme archétype (voir *figures* 2.10 et 7.19) ; tous les organites précédemment signalés dans la cellule animale (exception faite des lysosomes et des centrioles) y sont identifiables. Elle présente par ailleurs diverses structures originales ; deux d'entre elles sont communes à toutes les cellules végétales : la **paroi cellulosique** et les **vacuoles**. Les **chloroplastes**, en revanche, ne sont spécifiques que des cellules chlorophylliennes, photosynthétiques et autotrophes.

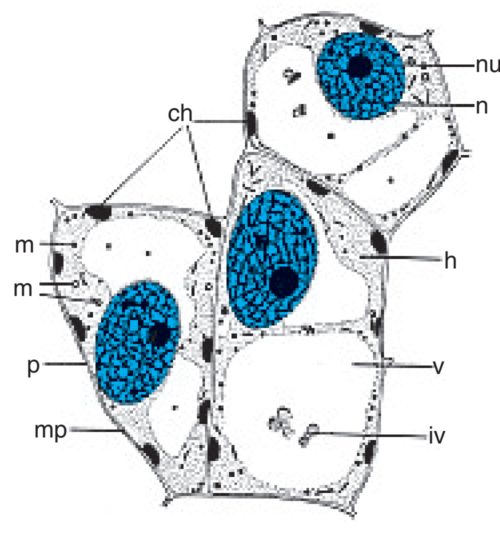


Figure 2.10

Schéma d'une coupe de cellules végétales typiques (cellules de parenchyme chlorophyllien) observée en microscopie photonique, après coloration

Les principaux organites sont identifiés.
ch : chloroplastes ; h : hyaloplasme ; iv : inclusions vacuolaires ; m : mitochondries, mp : membrane plasmique ; n : noyau ; nu : nucléole ; p : paroi ; v : vacuole.

La paroi cellulosique rigide est une production extracellulaire, doublant la membrane plasmique, et élaborée par chaque cellule ; elle confère une résistance mécanique à la cellule et limite les mouvements d'eau vers le cytoplasme, liés à la pression osmotique intracellulaire. La composition, l'organisation et l'épaisseur de cette structure constituent des éléments de différenciation cellulaire importants dans l'organisme végétal. La paroi peut être considérée comme une matrice extracellulaire, au sens défini chez les Animaux. La vacuole est une cavité limitée par une membrane simple, contenant une solution d'ions et de molécules organiques. Elle représente, dans certains tissus, la plus grande partie du volume cellulaire, le cytoplasme étant réduit à une fine pellicule difficilement visible et collée contre la paroi. Absente des cellules méristématiques, la vacuole constitue aussi un élément de différenciation structurale et physiologique. Les chloroplastes sont de gros organites lenticulaires, colorés en vert, d'un diamètre voisin de 10 µm, nettement visibles dans les seules cellules vertes. On trouve cependant leurs précurseurs incolores, de petite taille et peu différenciés, dans toutes les cellules du végétal. Divers types de plastes, caractérisés par une organisation, une composition et une fonction particulières, se rencontrent dans des tissus végétaux spécialisés.

Chez les Végétaux les plus complexes, où une vingtaine de types cellulaires distincts peuvent être recensés, la différenciation cellulaire n'atteint pas l'ampleur signalée chez les Animaux ; de plus, le degré de spécialisation y est en général beaucoup moins poussé. Ceci est à rapprocher du fait que les Plantes, contrairement aux Animaux, sont des êtres incapables de mobilité, fixés au sol et s'adaptant aux aléas du milieu, sans possibilité de leur échapper ; les cellules associées aux fonctions de relation (neurones, cellules sensorielles) échappent aux Végétaux. L'évolution a ainsi produit chez ces derniers une palette très diversifiée de mécanismes adaptatifs. Enfin, bien que la paroi semble isoler toutes les cellules les unes des autres, celles-ci communiquent entre elles au moyen d'une multitude de canalicules qui la traversent. L'organisme végétal dans son ensemble représente en réalité un continuum cytoplasmique complet, de la racine jusqu'aux bourgeons ; ce trait constitue une grande originalité par rapport aux Animaux.

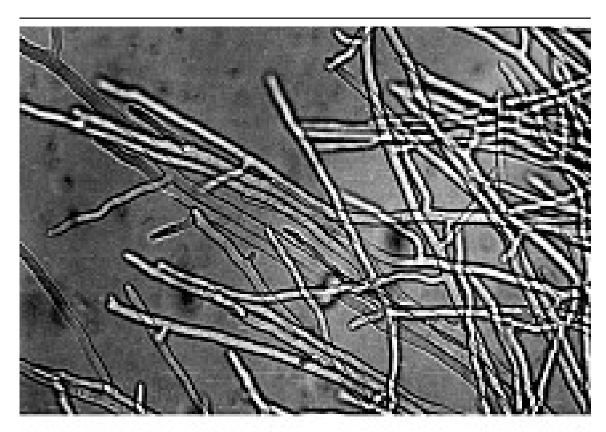
3.1.4. Champignons

Leurs cellules possèdent une organisation typiquement végétale, en ce sens qu'elles sont pourvues d'une paroi épaisse faisant office de squelette externe et d'une vacuole centrale occupant un volume important. Cependant, comme les cellules animales, elles ne contiennent pas de plastes et ne peuvent pas réaliser la photosynthèse ; leur mode de vie est donc, comme celles-ci, nécessairement hétérotrophe. Les Champignons sont des organismes osmotrophes. D'autres caractéristiques biochimiques les différencient en outre nettement des Végétaux verts : leur paroi contient un polymère typiquement animal (la chitine) et leurs réserves glucidiques sont constituées de granules de glyco-

gène directement accumulés dans le hyaloplasme (comme dans les cellules hépatiques des Vertébrés, par exemple), et non pas d'amidon (qui est stocké dans des plastes spécialisés chez les organismes chlorophylliens).

La structure cellulaire des Champignons est également originale et se distingue de celle de tous les autres Eucaryotes. Mis à part quelques espèces unicellulaires, telles que les levures (voir *figure* 2.5), la plupart d'entre elles présentent une structure mycélienne : l'appareil végétatif (ou thalle) est constitué de filaments cylindriques ramifiés, enchevêtrés et parfois anastomosés (*figure* 2.11). Au sein de ces filaments, de nombreux noyaux, en général très petits, peuvent cohabiter dans un même cytoplasme ; ce type de structure est qualifié de **cœnocytique** ou **syncytial**. Lorsque les filaments ne sont pas cloisonnés, on parle de **siphons** ; lorsqu'il existe des cloisons transversales, souvent percées de pores, il s'agit d'**hyphes**.

L'organisation cellulaire chez les Champignons semble moins strictement définie que chez les



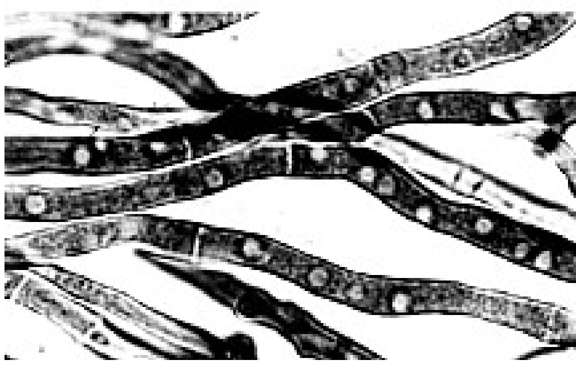


Figure 2.11
Photographies de filaments mycéliens d'un Champignon cultivé *in vitro*
En haut : vue générale des hyphes ramifiés ; en bas, aspect des articles contenant chacun plusieurs noyaux.

Animaux ou les Végétaux verts car on y trouve des cellules mono-, bi- ou plurinucléées (appelées **articles**) ; tous les intermédiaires existent donc entre la cellule vraie, uninucléée, et le syncytium où des milliers de noyaux partagent un même cytoplasme. Il faut signaler à ce sujet l'existence d'organismes présentant une structure de type **plasmodial** : il s'agit de fines masses cytoplasmiques uniques, parfois de grande taille (plus de 10 cm de diamètre), non limitées par une paroi rigide (donc molles et déformables), et contenant un nombre considérable de noyaux. Les plasmodes de Myxomycètes peuvent prendre des formes quelconques en s'étalant sur le substrat et en épousant ses reliefs.

Les Champignons se distinguent enfin des Végétaux verts par les modalités de leur division nucléaire : appareil mitotique différent et persistance de l'enveloppe nucléaire tout au long de la mitose. Malgré toutes ces particularités, ils sont parfois considérés comme des Végétaux car leur organisation générale et surtout leur mode de vie et de reproduction les rapprochent davantage des organismes chlorophylliens que des Animaux. Ils constituent, avec les **Algues**, l'ensemble des **Thallophytes** ; on les oppose aux **Cormophytes** qui possèdent un appareil végétatif différencié avec tige et feuilles bien développées.

3.1.5. Protistes

On rassemble sous ce terme tous les organismes eucaryotiques **unicellulaires** à l'exception des Champignons unicellulaires. Certains auteurs y ajoutent quelques êtres pluricellulaires d'organisation simple (Algues) et fortement apparentés à ceux, composés d'une seule cellule, qui représentent la majorité du groupe. Il s'agit d'un ensemble très hétérogène au plan systématique et réunissant un nombre d'embranchements considérable. Il peut exister une différence plus grande entre deux groupes de Protistes apparemment voisins qu'entre l'ensemble des Animaux et celui des Végétaux verts pluricellulaires ; la classification de ces êtres reste donc encore très discutée. Les Protistes se reproduisent par **multiplication végétative** (division binaire ou mitose), mais la plupart d'entre eux pratiquent aussi la reproduction sexuée, dans le cadre de cycles de vie d'une grande diversité.

On distingue : 1) les **Protophytes**, qui présentent les caractères des cellules végétales, avec paroi et

plastes, et sont des êtres chlorophylliens autotrophes et 2) les **Protozoaires**, qui sont de type animal, en ce sens qu'ils sont dépourvus de plastes, donc hétérotrophes, et en général mobiles.

Diverses formes possèdent cependant à la fois la motilité et l'autotrophie, de sorte que la frontière entre les deux groupes n'est pas très nette et apparaît souvent conventionnelle. Chez certaines espèces (Euglène), en fonction des conditions du milieu : richesse en nutriments, éclairement, on peut en outre observer un passage réversible de l'autotrophie à l'hétérotrophie, liée à une évolution des plastes qui régressent ou se développent de façon parallèle.

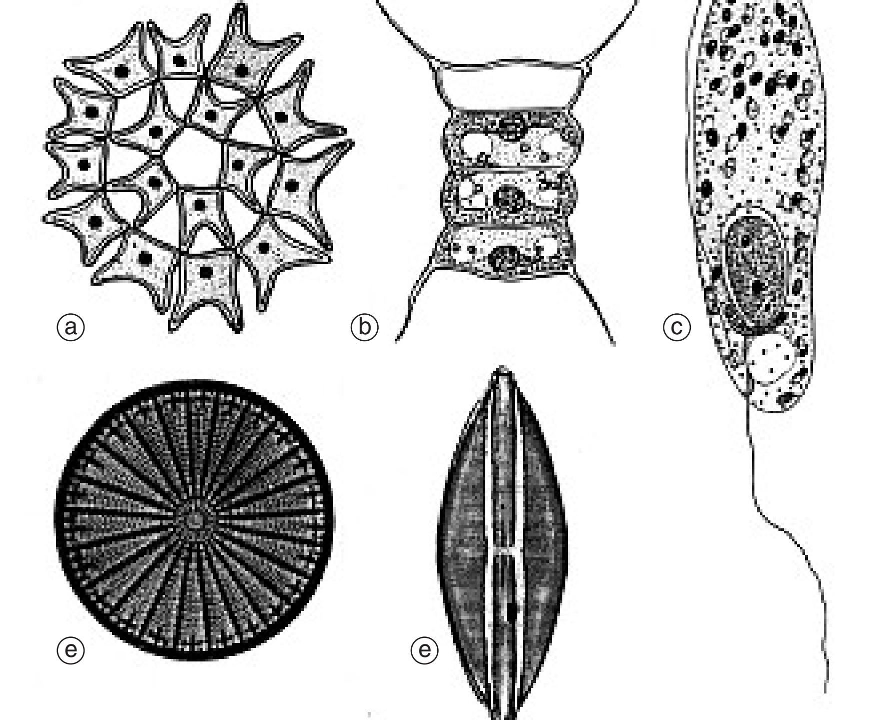
• Les Protophytes manifestent une diversité morphologique et structurale extraordinaire, qui tient essentiellement à trois facteurs :

– la présence d'une paroi ou d'une enveloppe qui peut être interne ou externe, continue ou discontinue (formée d'écailles juxtaposées ou superposées), minéralisée ou pas ; la nature chimique de cette paroi est très variable selon les groupes ;
– la présence ou l'absence d'un système locomoteur, constitué d'un ou plusieurs flagelles ;
– l'organisation des plastes et la nature des pigments photosynthétiques ; sur la base de ce critère fondamental, les Protophytes se répartissent en fait dans tous les groupes d'Algues.

Quelques exemples de ces micro-organismes sont donnés dans la *figure* 2.12.

• Les Protozoaires présentent également une diversité considérable et constituent un groupe hétérogène dont le découpage systématique est encore sujet à discussion. Par définition unicellulaires, ils comprennent aussi des formes plurinucléées de grande taille (atteignant l'échelle du centimètre), dans lesquelles des dizaines ou des centaines de noyaux partagent une même masse de cytoplasme ; cette exception n'est que superficielle car il existe à un moment donné de leur cycle de vie un stade unicellulaire typique. Les Protozoaires ont souvent une anatomie d'une très grande complexité, qui atteint sans doute son maximum de développement dans le groupe des **Ciliés** ; ce sont les cellules eucaryotiques les plus sophistiquées que l'on puisse rencontrer (voir *figure* 2.13).

Ces micro-organismes ne sont pas des cellules banales ; ils possèdent un nombre impressionnant



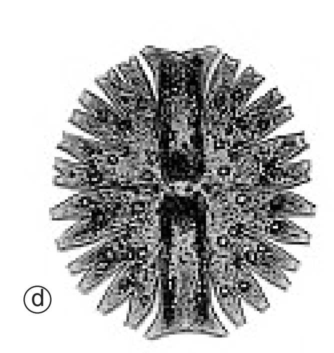


Figure 2.12

Aspect de quelques Algues unicellulaires (Protophytes)

Ces schémas n'illustrent qu'une faible partie de la diversité des formes qu'on peut y rencontrer.

(a) *Pediastrum* ;
(b) *Scenedesmus* ;
(c) *Vacuolaria* ;
(d) *Micrasterias* ;
(e) diatomées.

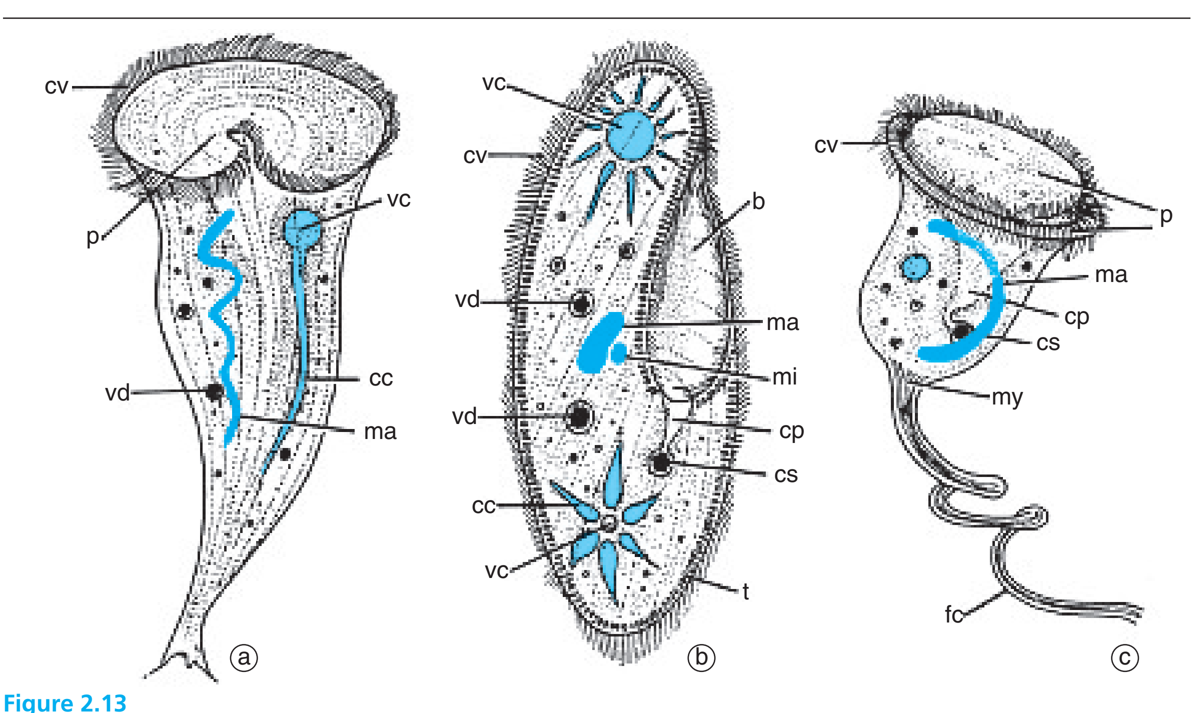


Figure 2.13

Aspect de quelques Protistes du groupe des Ciliés

Ces schémas illustrent la complexité de leur morphologie et de leur organisation interne.
(a) Stentor ; **(b)** Paramécie ; **(c)** Vorticelle.
b : bouche ; cc : canal collecteur ; cp : cytopharynx ; cs : cytostome ; cv : cils vibratiles ; fc : filament contractile ; ma : macronucléus ; mi : micronucléus ; my : myonèmes ; p : péristome ; t : trichocystes ; vc : vacuole contractile ; vd : vacuole digestive.

de dispositifs spécialisés leur permettant d'avoir un mode de vie autonome, comparable à celui de bien des organismes eucaryotiques pluricellulaires. Ils accomplissent les fonctions physiologiques suivantes :

– la locomotion est assurée par une multitude de cils dont la disposition très précise et le fonctionnement parfaitement coordonné permettent une nage rapide. Certains cils sont parfois regroupés en véritables « pattes » (cirres) permettant une marche des cellules sur le support ;
– la nutrition est permise grâce à une « bouche » munie de cils vibratiles : le **cytostome**, au fond de laquelle se forment des vacuoles de phagocytose à fonction digestive ; les résidus non digérés sont éliminés au niveau d'un **cytoprocte**. De nombreux Ciliés phagotrophes sont des prédateurs, se nourrissant d'autres Protistes vivants ou de Bactéries ;
– l'excrétion et l'osmorégulation sont assurées grâce à des systèmes de canaux convergeant vers des vacuoles contractiles éliminant l'eau absorbée par osmose ;
– la sensibilité aux facteurs mécaniques ou aux variations physicochimiques du milieu est permise grâce à des cils sensoriels ou des systèmes récepteurs divers ;
– la défense contre les prédateurs est possible grâce à des organites spécialisés appelés **trichocystes**, qui sont brutalement projetés à distance par la cellule agressée, et qui constituent autant de dards urticants ;
– la fonction squelettique est assurée par un système très sophistiqué de fibres cytoplasmiques et de microtubules qui organisent l'architecture cellulaire (**cytosquelette**).

Toutes ces fonctions, assurées chez les êtres pluricellulaires par des appareils formés de cellules différenciées, mettent la plupart du temps en jeu, chez les Ciliés, des éléments du cytosquelette. Sur la base de critères tels que le nombre de noyaux, le mode de locomotion (cils, flagelles, pseudopodes), le mode de reproduction et de division, le mode de vie (libre ou parasite), etc. on distingue actuellement huit embranchements parmi les Protozoaires. Les principaux groupes sont : les

Flagellés, les **Amibes,** les **Actinopodes** et les **Ciliés**. De très nombreux représentants de ces groupes vivent en parasites chez les Animaux domestiques et l'Homme et sont responsables de maladies graves : amibiases, toxoplasmoses, paludisme, trypanosomiases (maladie du sommeil).

3.2. Plan d'organisation procaryotique

3.2.1. Caractéristiques générales des organismes procaryotiques

Les organismes procaryotiques sont en grande majorité unicellulaires, généralement de forme sphérique ou en bâtonnets (voir *figure* 2.14). Les plus complexes d'entre eux présentent cependant une organisation filamenteuse (où toutes les cellules sont identiques, sauf exception), ou bien de type pseudomycélien (avec des filaments «plurinucléés» présentant des ramifications, à la manière de ce qu'on observe chez les Champignons). Les cellules qui les constituent ont une taille moyenne comprise entre 1 et 10 µm, mais certaines d'entre elles atteignent exceptionnellement des tailles de l'ordre de 0,1 à 1 mm. On utilise souvent le terme générique de **Bactéries** pour désigner les différentes espèces de Procaryotes.

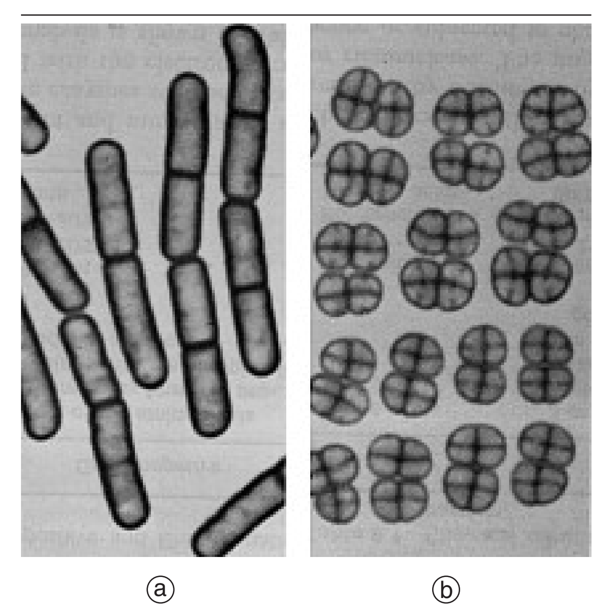


Figure 2.14
Morphologie de quelques cellules bactériennes : bacilles et coques (× 2 600)
(a) *Bacillus megaterium* ; **(b)** *Tetracoccus canadensis* (d'après Robinow).

Le plan d'organisation cellulaire est ici considérablement plus simple que celui décrit pour les Eucaryotes. De façon générale, les seules membranes rencontrées dans ces cellules sont celles qui les limitent, ou bien des systèmes membranaires internes qui en dérivent et y sont plus ou moins directement associés. L'intérieur de la cellule ne présente donc pas d'organites et de compartimentation poussée (ce qui n'exclut pas une localisation préférentielle de certaines enzymes) ; en particulier, le patrimoine génétique n'est pas enfermé dans un système membranaire clos et il n'existe pas de «noyau vrai». Ceci entraîne une continuité entre les lieux où se déroulent les différentes étapes de l'expression de l'information génétique ; l'organisation moléculaire du matériel génétique est, probablement en rapport avec ce fait, très différente chez les Procaryotes et les Eucaryotes.

Les mouvements intracellulaires sont absents dans les cellules procaryotiques, de même que les processus d'endo- et d'exocytose, car il n'existe pas de cytosquelette au sein de leur cytoplasme. Une caractéristique remarquable de très nombreux Procaryotes est l'existence d'une **double membrane limitante**, la membrane cytoplasmique classique étant doublée extérieurement par une autre membrane phospholipidique typique.

À quelques exceptions près, concernant des Bactéries parasites très simplifiées, toutes les cellules procaryotiques sont pourvues d'une paroi rigide plus ou moins épaisse ; celle-ci assure un rôle de protection mécanique qui est rendu nécessaire par la pression osmotique interne très élevée. Le type d'organisation de la paroi et des membranes limitantes constitue une base importante de la classification chez les Bactéries «classiques», dites **Eubactéries**. La motilité cellulaire est généralement assurée par des flagelles, à structure simple et à mode de fonctionnement particulier (rotation), qui sont fondamentalement différents de ceux observés chez les Eucaryotes ; certaines formes sont mobiles par glissement sur le support.

La division chez les Procaryotes présente des modalités très simplifiées, comparé à ce que l'on décrit chez les Eucaryotes. La duplication de l'unique chromosome bactérien est coordonnée avec la croissance, de sorte que la division a lieu immédiatement après la fin de cette duplication. Les deux chromosomes-frères, reliés à la membrane plasmique, sont séparés par une cloison qui partage la cellule initiale en deux ; ce type de division simple est nommé **scissiparité**. Dans des

conditions favorables de température et de milieu, certaines espèces comme *Escherichia coli* se multiplient toutes les 20 minutes. Il n'existe pas chez les Bactéries de phénomène de sexualité vraie ; des échanges de matériel génétique et des phénomènes de recombinaison ont lieu, mais ils concernent chaque fois une faible proportion du matériel génétique. De plus, il ne s'agit pas d'échanges réciproques entre partenaires car le transfert reste unidirectionnel, entre une cellule donneuse et une cellule receveuse. Les Procaryotes fonctionnent sur le «mode haploïde», ce qui les rend plus sensibles que la plupart des Eucaryotes aux phénomènes de mutation et de sélection naturelle.

Au plan métabolique, les Procaryotes présentent une diversité considérable de types trophiques, c'est-à-dire de modes de capture de la matière et de l'énergie dans le milieu (voir chapitre 1). Certains sont capables de fixer l'azote atmosphérique ; d'autres peuvent réaliser la photosynthèse à partir de l'eau ou de dérivés soufrés, ou bien oxyder un grand nombre de composés minéraux et à peu près toutes les molécules organiques connues. Ils tirent de l'énergie à partir de ces derniers en réduisant l'O_2 ou bien des anions minéraux tels que NO_3^- ou SO_4^{2-} ; ce sont les seuls êtres vivants à pratiquer les **chimiosynthèses**. Ils participent à ce titre de façon cruciale aux grands cycles des éléments de la biosphère (cycles de l'azote, du soufre, du carbone). Occupant une variété incomparable de niches écologiques, on les rencontre parfois dans des milieux physicochimiques extrêmes, où ils sont les seuls à survivre.

3.2.2. Eubactéries

Ce sont les Procaryotes les plus anciennement identifiés par les microbiologistes. Ils sont classés, depuis 1880, sur la base du test de coloration dit «de Gram» (voir chapitre 14), en deux grands groupes correspondant à deux types d'organisation des enveloppes limitantes, comme l'a montré ultérieurement la microscopie électronique ; il s'agit des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif.

• **Les Bactéries à Gram négatif.** Ce sont les plus abondantes, en nombre de genres ; très diversifiées, elles correspondent sans doute à plusieurs phylums distincts. Plusieurs groupes réalisent la photosynthèse (dont il existe d'ailleurs plusieurs modalités) ou les chimiosynthèses et sont autotrophes ; certains d'entre eux, capables de fixer l'azote atmosphérique, se classent parmi les êtres vivants chimiquement les plus autonomes de la planète. Ces Bactéries sont caractérisées par la présence de deux membranes phospholipidiques limitantes encadrant un espace nommé **périplasme**, qui inclut une fine couche d'un complexe macromoléculaire appelé **peptidoglycane**. C'est ce dernier qui confère rigidité et solidité à la cellule bactérienne ; sa composition et son organisation complexes seront examinées dans le chapitre 14.

Les deux membranes ont une composition et une structure très différentes. La membrane cytoplasmique comprend, parmi ses protéines, de nombreux transporteurs transmembranaires de métabolites, ainsi que des complexes de transport d'électrons et de synthèse d'ATP (par couplage chimiosmotique ; voir chapitre 10). La membrane externe est percée de nombreux pores, constitués d'une protéine nommée **porine**, laissant passer des molécules dont la masse moléculaire va jusqu'à 1 500 Da. Elle porte, du côté externe, de nombreux résidus glucidiques accrochés à des lipides (voir *figure* 2.15).

Parmi les principaux groupes, on peut citer :

– les **Bactéries pourpres et vertes** photosynthétiques, anaérobies, qui métabolisent le soufre et les dérivés soufrés (sulfobactéries) et un nombre encore plus élevé de Bactéries apparentées, aérobies, ayant perdu leur capacité photosynthétique et leur caractère autotrophe : les bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*), les Entérobactéries (*Escherichia coli*) et les Myxobactéries, à paroi mince et flexible ;

– les **Cyanobactéries**, dont les cellules sont caractérisées par une taille relativement grande et une organisation interne plus complexe que les précédentes, en raison de la présence dans le hyaloplasme de nombreux **thylakoïdes** (sacs membranaires aplatis à rôle photosynthétique). Elles réalisent une photosynthèse oxygénique identique à celle des Végétaux supérieurs. Elles forment parfois des thalles gélatineux macroscopiques (Nostoc) (voir la *figure* 2.16).

• **Les Bactéries à Gram positif** sont caractérisées par une enveloppe comportant une seule membrane limitante : la membrane cytoplasmique, doublée d'une épaisse couche de peptidoglycane, composé ici d'un nombre important de feuillets superposés et organisés en un édifice tridimensionnel covalent très résistant. Ce dernier est traversé dans son épaisseur par des molécules

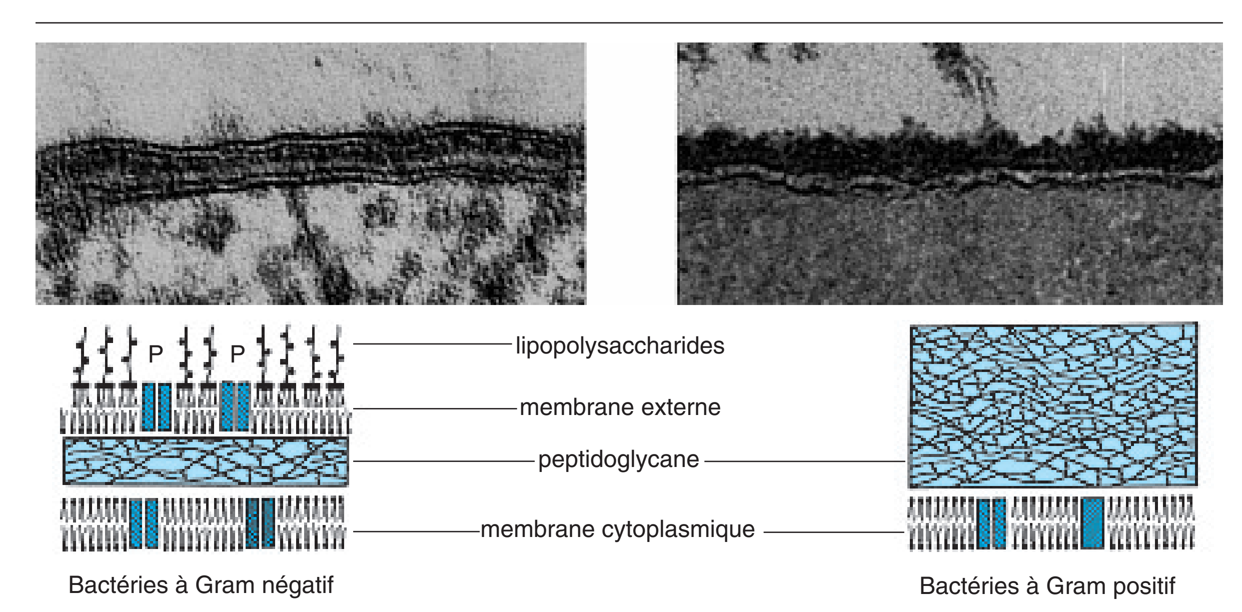


Figure 2.15

Organisation de la paroi et des membranes limitantes des Bactéries à Gram négatif (à gauche) et à Gram positif (à droite)

Noter la présence d'une membrane externe munie de pores protéiques (P = porine) et de glycolipides particuliers (lipopolysaccharides) chez les Bactéries à Gram négatif.
Grossissement : × 190 000.

spécifiques, appelées acides teichoïques (polymères d'alcool-phosphates). Toutes les Bactéries de ce groupe sont hétérotrophes et répandues dans des milieux très divers : l'eau et le sol, en particulier, en contiennent un grand nombre ; beaucoup sont des parasites des animaux et de l'Homme et sont pathogènes (voir *figure* 2.16). On peut citer : les ***Bacillus*** et les **Clostridies**, les **Actinomycètes**, qui produisent une grande diversité d'antibiotiques, et enfin les **Mycoplasmes**, parasites obligatoires des cellules animales ou végétales, qui sont des cellules sans paroi et très simplifiées (les plus simples qui soient, avec environ 750 gènes, soit quatre fois plus seulement que les Virus les plus complexes).

3.2.3. Archébactéries

L'identification de ce groupe très original de Procaryotes date de la fin des années 70 ; caractérisées d'abord pour la plupart par des modes de vie ou des métabolismes assez particuliers, elles sont en fait évolutivement différentes à la fois des Eubactéries et des Eucaryotes. Des données biochimiques, physiologiques et moléculaires très nombreuses, en font un groupe à part des autres êtres vivants. L'organisation de leurs enveloppes, leur sensibilité aux antibiotiques, les caractéristiques de leurs enzymes intervenant dans les processus génétiques fondamentaux, leur métabolisme photosynthétique ou chimiosynthétique, sont uniques ou bien partagés à la fois avec ceux des Eubactéries ou des Eucaryotes. Un résumé comparatif de leurs caractéristiques sera donné dans le chapitre 16. On peut citer les groupes suivants :

– les **Bactéries méthanogènes**, anaérobies strictes et produisant du méthane. On les trouve en particulier dans les eaux stagnantes et dans le tractus intestinal de nombreux Animaux ; elles sont la principale source de méthane atmosphérique. La plupart des espèces réduisent le CO_2 à partir de H_2, ce qui en fait des organismes tout à fait remarquables ;
– les **Halobactéries**, qui sont des halophiles extrêmes, exigeant des concentrations salines très élevées (jusqu'à 30 % de NaCl), sont rencontrées dans les lacs salés ou les saumures alimentaires. Certaines possèdent un mécanisme original de capture de la lumière, à la base d'une photosynthèse très particulière (voir chapitre 6) ;
– les **Thermophiles extrêmes**, aérobies ou anaérobies, qui vivent dans des conditions écologiques étonnantes : milieux très acides (jusqu'à pH1), à des températures dépassant 100 °C. On les trouve

Figure 2.16

Organisation interne de quelques types classiques de cellules bactériennes

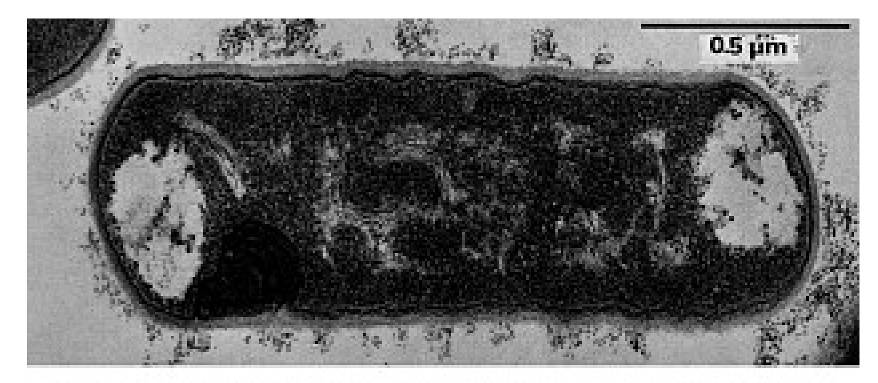
De haut en bas et de gauche à droite :

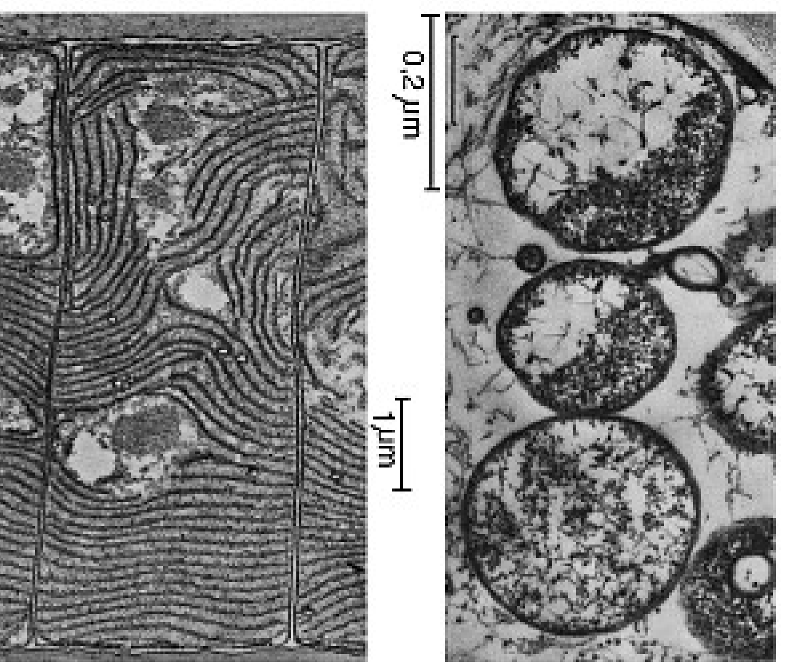
– Bactéries à Gram positif (genre *Lactobacillus* ; Bactérie lactique) ;

– Cyanobactéries (genre *Oscillatoria* ; noter l'abondance des thylakoïdes dans le cytoplasme, ainsi que la taille de ces cellules, exceptionnellement grande pour des Procaryotes) ;

– Mycoplasmes (parasites intracellulaires de type Gram positif ; noter l'absence de paroi).

Les zones claires d'aspect fibrillaire au sein du cytoplasme représentent le nucléoïde bactérien. Voir aussi la photo 11.22, qui représente une cellule de Spirochète. (Clichés Labo BG et Labo BV, Orsay).





dans les sources chaudes sulfureuses volcaniques ou au niveau des évents sous-marins des dorsales océaniques ; leur métabolisme chimiosynthétique est d'une incomparable diversité.

Pour toutes ces raisons, les Archébactéries occupent une place unique parmi les êtres vivants actuels ; les classifications les plus récentes divisent donc le monde vivant en trois règnes primaires : les **Archaea**, les **Bacteria** et les **Eucarya**. L'origine évolutive de ces trois groupes sera brièvement discutée dans le chapitre 16.

Résumé

Bien que les premières observations datent de la fin du XVIe, la notion moderne de cellule, qui unifie le monde vivant, est récente. Les Protistes et les cellules végétales ont été les premiers objets biologiques décrits à l'échelle du microscope. Les progrès de ce dernier, au début du XIXe, conduisent en un siècle à la description de presque toutes les structures des cellules eucaryotiques. Les microscopes photonique et électronique permettent l'observation en transmission d'objets « transparents ». Le pouvoir séparateur du premier microscope est de 0,25 µm ; il est amélioré d'un facteur 1000 chez le second. Grâce à celui-ci, les ultrastructures cellulaires et même certaines molécules biologiques deviennent visibles.

L'observation de cellules vivantes est possible si on utilise des colorants vitaux ou des dispositifs physiques appropriés ajoutés au microscope photonique. De façon générale, le matériel biologique doit être traité pour pouvoir être débité en coupes fines et transparentes, qui sont ensuite colorées. Des protocoles spécifiques existent pour l'histologie classique ou électronique. L'observation des formes et des surfaces à l'échelle des ultrastructures ou des molécules est possible grâce à la réalisation de répliques (cryofracture) ou à la microscopie à balayage.

Le monde vivant est découpé en deux groupes caractérisés par des plans d'organisation cellulaire très différents : les Procaryotes et les Eucaryotes. Les premiers présentent des cellules de petite taille (1-10 µm), à organisation interne simple, dépourvues d'organites et protégées par une paroi plus ou moins épaisse. Ce sont des micro-organismes présentant des métabolismes d'une extrême diversité, ce qui leur permet d'occuper des niches écologiques très variées ; leur rôle dans les grands cycles des éléments sont fondamentaux. On y distingue deux grands groupes : les Eubactéries et les Archébactéries, qui diffèrent par de nombreux caractères biochimiques, moléculaires et physiologiques, et sont aussi différents l'un de l'autre qu'ils le sont eux-mêmes des Eucaryotes.

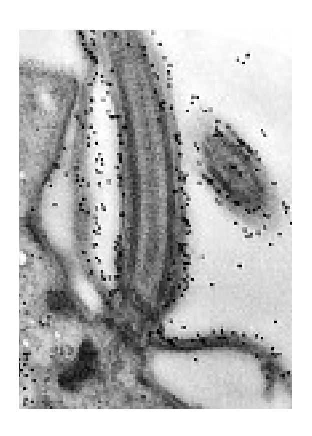
Les Eucaryotes ont des cellules de taille relativement grande (10-100 µm), dont l'organisation est rendue complexe par la présence de nombreuses structures membranaires internes, appelées organites. La richesse de leur matériel génétique conduit à produire des êtres pluricellulaires de grande taille, dont le degré de différenciation des types cellulaires associés peut être considérable.

En fonction de divers critères d'organisation cellulaire, de physiologie et de biochimie, on distingue les Animaux, les Végétaux et les Champignons ; les Protistes sont des Eucaryotes unicellulaires représentant un groupe morphologiquement et évolutivement très hétérogène, dont les cellules constituent parfois à elles seules des organismes très complexes.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. De quelle époque datent les premières observations de cellules ?
2. Comment définit-on un microscope à transmission ?
3. Qu'appelle-t-on «ouverture numérique» d'un objectif de microscope et comment peut-on aisément augmenter sa valeur pour améliorer le pouvoir séparateur ?
4. Quel est le pouvoir séparateur des meilleurs microscopes photonique et électronique à transmission ?
5. Quel est le principe de la microscopie à fluorescence ?
6. Qu'appelle-t-on «profondeur de champ» ? en quoi consistent les «coupes optiques» ?
7. Quels sont les principaux dispositifs physiques associés au microscope photonique ?
8. Décrire les principales étapes d'un protocole d'histologie classique ou électronique.
9. En quoi consistent les techniques de microscopie électronique nommées : coloration négative et ombrage métallique, et que permettent-elles de bien visualiser ?
10. Quelles techniques de microscopie électronique permettent d'observer la surface des objets biologiques ?
11. Nommer les 4 grands groupes d'êtres vivants qui constituent les Eucaryotes et donner leurs principales caractéristiques.
12. Quels sont les organites, communs aux cellules animales et végétales, qui sont caractéristiques des Eucaryotes ?
13. Nommer les organites et les structures propres aux cellules végétales.
14. En quoi l'organisation cellulaire des Champignons est-elle originale par rapport à celle des autres Eucaryotes ?
15. Quelles caractéristiques distinguent les Champignons des Végétaux verts ?
16. En quoi les Protistes Ciliés peuvent-ils être considérés comme des organismes à part entière, bien qu'ils soient unicellulaires ?
17. Quelles caractéristiques fondamentales différencient les Procaryotes des Eucaryotes ?
18. Citer les principaux groupes d'Eubactéries.
19. Quelles caractéristiques structurales permettent de différencier les Eubactéries Gram négatives des Eubactéries Gram positives ?
20. Citer les principaux groupes d'Archébactéries et expliquer pourquoi certains groupes sont qualifiés «d'extrémophiles».



Chapitre 3

ANALYSE DES CONSTITUANTS ET DU FONCTIONNEMENT DES CELLULES

Dans le chapitre précédent, nous nous sommes intéressés aux aspects purement statiques de l'analyse des structures des cellules, et indépendamment de la nature de leurs molécules constitutives. La description des organites qui a été donnée, y compris au moyen des techniques d'observation les plus perfectionnées, a été conduite sans qu'aucune connaissance chimique soit apportée. L'objectif de ce chapitre est de montrer comment on peut : 1) localiser des molécules simples ou complexes, au niveau des différentes structures cellulaires identifiées par la cytologie, et 2) analyser leurs transformations chimiques ou leurs déplacements dans les cellules, c'est-à-dire aborder le fonctionnement et la dynamique de la matière vivante.

Après avoir rappelé les principales techniques analytiques utilisées en biochimie et en physiologie cellulaire, nous décrirons les méthodes et les outils propres à cette dernière discipline, qui permettent de faire le lien entre les molécules et les structures, puis entre les structures et les fonctions. L'approche cytologique connaît depuis quelques années des progrès considérables, de sorte qu'il est maintenant possible de détecter précisément n'importe quelle macromolécule spécifique (protéine ou acide nucléique) au sein des cellules, aussi bien à l'échelle des structures visibles en microscopie photonique qu'à celle des ultrastructures. L'analyse morphologique de ces macromolécules, isolées et purifiées, est également accessible grâce à diverses techniques de microscopie électronique.

Une méthode réductionniste, déjà ancienne mais toujours d'actualité, permet de « décomposer » les cellules en leurs organites constitutifs : le **fractionnement cellulaire** fournit des systèmes biologiques simplifiés et facilite beaucoup leur analyse chimique et fonctionnelle. L'étude *in vivo* du métabolisme cellulaire est conduite grâce à l'utilisation des radio-isotopes, dont la sensibilité de détection est très grande ; elle est complétée par les techniques du fractionnement cellulaire qui permettent de mieux disséquer les voies métaboliques au sein des organites et des cellules. La cytologie permet aussi une approche fonctionnelle dans la mesure où existent des techniques, récemment renouvelées, de visualisation directe d'activités enzymatiques dans les cellules.

Les cultures de cellules produisent un matériel biologique très homogène et reproductible, permettant l'analyse de nombreuses activités cellulaires. Grâce aux méthodes puissantes de la génétique : mutagenèse et sélection de mutants (en particulier, les mutants conditionnels), les chercheurs disposent de riches collections de souches dont les fonctions les plus diverses sont altérées de façon ponctuelle ; combinée aux autres approches, leur étude aide à comprendre le fonctionnement des cellules normales.

1. MÉTHODES D'ANALYSE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

Ces méthodes d'analyse ont un double objectif : 1) établir, dans le cadre d'une recherche globale, un catalogue des molécules constituant un échantillon biologique donné, indépendamment de leur fonction, et 2) repérer dans une fraction, ou localiser dans une structure, une seule espèce moléculaire déjà connue, dans le cadre d'une approche plus ciblée, fonctionnelle par exemple. L'encart historique suivant donne les dates des principales découvertes dans ce domaine.

1.1. Fractionnement chimique

Les techniques de séparation les plus anciennes et aussi les plus brutales consistent, dans un premier temps, à séparer les petites molécules (organiques ou minérales) des macromolécules ; ces dernières présentent des propriétés physicochimiques spécifiques qui sont utilisées à cet effet : on parle alors de **fractionnement chimique**. Lorsqu'un extrait biologique brut, tel qu'un homogénat, est traité par un acide fort à froid, les macromolécules (en particulier, les protéines) sont dénaturées et forment des précipités faciles à sédimenter par **centrifugation**. Le surnageant contient tous les précurseurs organiques solubles dans l'eau : acides aminés, glucides, nucléotides, produits de dégradation…, ainsi que les ions minéraux. La chaleur, les fortes concentrations salines, certains composés chimiques ou solvants produisent des effets identiques.

Pour séparer les composés organiques, on utilise aussi leurs propriétés de solubilité différentielle, en fonction de la concentration saline, du pH du milieu, ou de différents solvants… On peut citer, par exemple, la précipitation par un alcool, en présence d'un sel concentré, des acides nucléiques en solution aqueuse. Dans ces conditions, ceux-ci sont neutralisés, deviennent moins solubles et floculent ; on les récupère ensuite par centrifugation. Cette technique est très utilisée en biologie moléculaire pour purifier rapidement les ADN et les ARN. Les composés lipidiques hydrophobes (graisses, huiles, phospholipides) sont séparés des composés hydrosolubles par solubili-

ENCART HISTORIQUE

Principales techniques analytiques utilisées en biologie

1895-1912 : mise en évidence des rayons X par ROENTGEN et développement des profils de diffraction des rayons X pour l'analyse de cristaux minéraux.

1906 : invention par TSWETT de la chromatographie de partage sur colonne et séparation des pigments d'un extrait organique de feuilles.

1925-1935 : SVEDBERG met au point et perfectionne la technique d'ultracentrifugation analytique pour déterminer les constantes de sédimentation des protéines ; il estime la masse moléculaire de l'hémoglobine à 68 000 Da.

1930 : utilisation d'un isotope lourd (^{15}N), fourni sous forme d'acide aminé substitué, pour démontrer le renouvellement très rapide de la matière vivante (turn-over).

1933 : mise au point par TISELIUS de l'électrophorèse en phase liquide pour la séparation des protéines.

1934-1941 : présentation des premiers diagrammes de diffraction des rayons X de protéines cristallisées (pepsine) et d'ADN.

1938-1940 : utilisation des radio-isotopes comme traceurs pour l'analyse du métabolisme intermédiaire des glucides et des lipides.

1942-1944 : mise au point de la chromatographie de partage sur papier.

1946 : mise au point de la chromatographie sur colonne d'amidon et sur résine échangeuse d'ions.

1948 : HOGEBOOM, SCHNEIDER et PALADE perfectionnent les méthodes de la centrifugation différentielle en vue du fractionnement cellulaire.

1953 : publication de la première séquence d'acides aminés d'une protéine : l'insuline, par SANGER et son équipe, après dix ans de travail.

1955 : mise au point de l'électrophorèse sur gel d'amidon pour la séparation des protéines.

1959 : mise au point des supports de polyacrylamide (gels) pour l'électrophorèse des protéines.

1960 : publication des premières structures tridimensionnelles détaillées de protéines (myoglobine et hémoglobine) obtenues à partir de

diagrammes de diffraction des rayons X. Il faudra attendre encore quinze ans pour avoir la structure équivalente d'un ARNt.

1975 : perfectionnement des techniques d'électrophorèse des protéines et développement de l'électrophorèse bidimensionnelle à haute résolution (O' FARRELL).

1975-1977 : développement de techniques relativement simples permettant de séquencer rapidement de longs fragments d'ADN.

1984 : mise au point de l'électrophorèse en champ pulsé permettant de séparer de très grosses molécules d'ADN, y compris des chromosomes entiers (par exemple, ceux de la levure de bière).

sation à chaud dans un solvant organique, tel que le benzène ou l'éther, suivie d'une séparation des deux phases.

Enfin, une méthode plus résolutive permet de séparer aisément les macromolécules natives en solution des composés de faible masse moléculaire (sels minéraux ou précurseurs organiques), par une opération dite de « filtration sur gel », ou **tamisage moléculaire** (voir plus loin). Cette technique consiste en une « chromatographie » sur colonne utilisant un gel poreux formé de microbilles de nature polysaccharidique ; il s'agit d'une filtration par exclusion car les plus grosses molécules sont éluées les premières et donc séparées des autres.

1.2. Techniques analytiques en biochimie et biologie cellulaire

1.2.1. CHROMATOGRAPHIE ET ÉLECTROPHORÈSE

Les différentes espèces chimiques de faible masse moléculaire appartenant au groupe des précurseurs peuvent être séparées les unes des autres puis récupérées individuellement, grâce à trois techniques majeures : les **chromatographies de partage** et par **échange d'ions**, et l'**électrophorèse**. Ces techniques utilisent respectivement les propriétés de solubilité différentielle des composés dans des solvants ou des mélanges de solvants variés (phase mobile), ou encore les différences de charge électrique. Elles permettent aisément de séparer les sucres simples, les acides aminés, les acides organiques et les acides gras, les nucléotides… La mise en œuvre des diverses formes de chromatographie nécessite l'emploi de supports poreux (phase stationnaire) permettant le déplacement des molécules ; ceux-ci peuvent être soit une simple feuille de papier filtre, soit une fine couche de silice ou de cellulose coulée sur un support plan (verre, plastique), soit une masse pulvérulente contenue dans une colonne de verre (chromatographie sur colonne).

• Dans le cas de supports plans, la méthode de **chromatographie de partage bidimensionnelle** est mise en œuvre et se pratique de la façon suivante : on procède d'abord à une première chromatographie, dans un premier système de solvants et portant sur un seul échantillon (un seul *spot* déposé latéralement, dans un coin du support). La plaque est ensuite séchée, tournée de 90° et soumise à une deuxième migration dans un système de solvants différent du premier, donnant un autre type de séparation. Après cette nouvelle migration, les constituants du mélange sont répartis sur toute la surface de la plaque et donc mieux séparés qu'après une migration monodimensionnelle (voir *figure* 3.1).

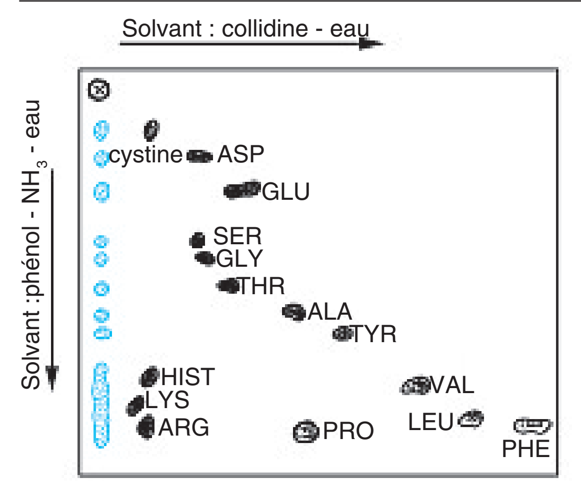


Figure 3.1

Chromatographie de partage bidimensionnelle

Un mélange d'acides aminés issus de l'hydrolyse d'une protéine est séparé en deux dimensions grâce à l'utilisation de deux mélanges de solvants différents. La croix, en haut et à gauche, représente le point de dépôt de l'échantillon analysé. Le résultat de la première chromatographie (monodimensionnelle) est représenté sous forme de taches en pointillés de couleur situées à la verticale du dépôt.

• La chromatographie sur colonne dite ***HPLC*** (ou CLHP : chromatographie liquide à haute performance) est la plus récente parmi ces techniques. Utilisant des supports poreux très finement divisés et fortement compressés, elle nécessite un fonctionnement à des pressions élevées pour que l'écoulement soit suffisamment rapide. Bien qu'exigeant un appareillage sophistiqué et coûteux, les possibilités considérables de sensibilité et de résolution de l'*HPLC* en font une méthode analytique et préparative d'un grand intérêt. En outre, elle permet aussi bien de séparer des petites molécules que des macromolécules.

• La chromatographie et l'électrophorèse sont aussi des méthodes de séparation privilégiées des macromolécules. Les protéines natives et fonctionnelles, extraites dans des conditions douces, sont séparées en fonction de leur taille par **tamisage moléculaire** sur un support constitué de microbilles poreuses (voir *figure* 3.2), ou bien en fonction de leur charge électrique, par chromatographie sur **colonne échangeuse d'ions**. La **chromatographie d'affinité** est utilisée pour isoler les protéines susceptibles de lier un ligand spécifique ; dans ce cas, le ligand purifié est chimiquement accroché au support poreux de la colonne et il retient la seule protéine en solution qui ait de l'affinité pour lui au cours de l'élution du mélange de protéines initial. Cette technique très puissante permet d'isoler des protéines minoritaires difficiles à purifier autrement (voir *figure* 3.3).

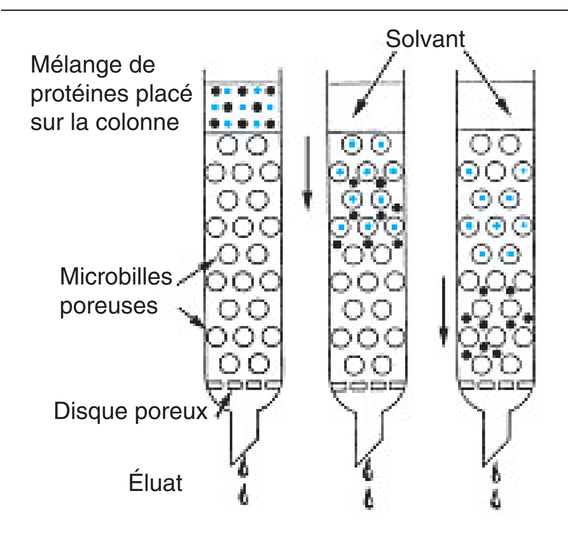


Figure 3.2

Principe du tamisage moléculaire sur un support de microbilles poreuses : chromatographie d'exclusion

Les molécules les plus petites (colorées) peuvent pénétrer au sein des microbilles, tandis que les plus grosses en sont exclues et passent seulement entre elles. Au cours de l'élution sur une colonne, la séparation des deux catégories de molécules est due à la différence de trajet parcouru, les plus petites étant les plus ralenties.

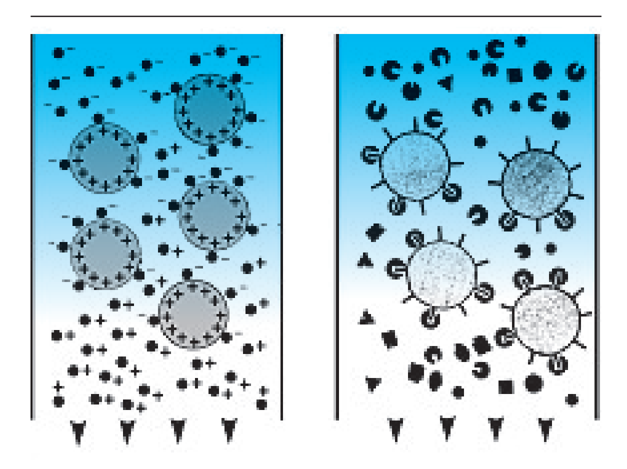


Figure 3.3

Principes de la chromatographie par échanges d'ions et de la chromatographie d'affinité

À gauche, aspect schématique des microbilles portant des groupements chimiques chargés positivement, auxquels les molécules de charge électrique opposée ont tendance à se fixer ; celles-ci seront ainsi retenues sur la colonne.
À droite, aspect schématique des microbilles auxquelles on a greffé un ligand approprié capable de fixer une seule espèce moléculaire, qui sera ainsi retenue sur la colonne.

• L'électrophorèse est une méthode de choix pour séparer, en présence d'un champ électrique, les centaines ou les milliers d'espèces moléculaires de protéines et d'acides nucléiques constituant les mélanges naturellement rencontrés dans les cellules. Dans le cas des protéines, on distingue l'électrophorèse des protéines natives de celle des protéines dénaturées et séparées en leurs polypeptides constitutifs. La première méthode est réalisée dans des conditions physicochimiques conservant les propriétés biologiques des molécules (enzymatiques, par exemple). Elle nécessite un support poreux lâche : papier, gel d'amidon, qui permet leur séparation sur la base de leur charge électrique (en fait, le rapport charge/masse) ; elle permet la réalisation de **zymogrammes**. La seconde méthode implique l'utilisation de détergents ioniques forts (SDS ; voir p. 122), et de composés réducteurs (β-mercaptoéthanol), qui séparent et dénaturent totalement les différents polypeptides formant les protéines complexes. En se fixant aux polypeptides, le SDS leur confère une charge négative

approximativement proportionnelle à leur masse ; la séparation s'effectue sur un support poreux serré (gel d'agarose ou de polyacrylamide) qui sépare les molécules selon leur taille, les plus petites migrant le plus rapidement (**électrophorèse dénaturante**).

• Sur la base de ces principes a d'abord été développée l'**électrophorèse monodimensionnelle**, dans laquelle les différents polypeptides ou protéines sont séparés en ligne, le long d'un seul canal ; cette méthode permet de distinguer seulement 100 à 200 fractions dans un échantillon qui peut contenir un millier d'espèces moléculaires.

L'**électrophorèse bidimensionnelle** combine deux types de migration conduits dans deux dimensions perpendiculaires l'une à l'autre. La première migration sépare les protéines natives de l'échantillon selon leur pH isoélectrique (focalisation isoélectrique) et la seconde, leurs éventuels polypeptides constitutifs, selon la taille, après dénaturation par le SDS. De cette façon, les différents éléments d'un mélange sont répartis sur une grande surface, ce qui augmente considérablement la résolution de la séparation ; on peut ainsi discerner plus de 1 000 taches correspondant chacune à un polypeptide (voir *figure* 3.4).

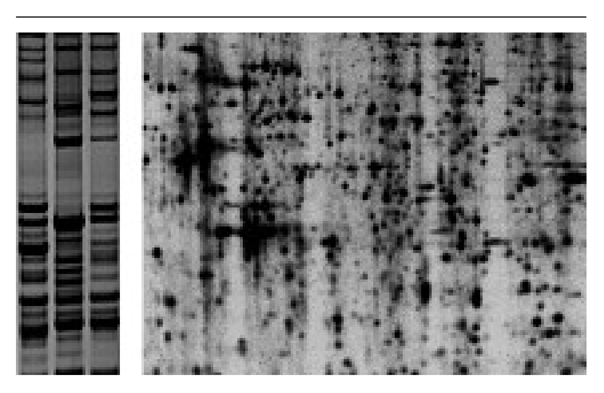


Figure 3.4

Séparation de protéines dénaturées par électrophorèse monodimensionnelle (à gauche) et bidimensionnelle (à droite), sur gels de polyacrylamide

Dans le premier cas, chaque canal correspond à un échantillon de protéines donné, tandis que dans le second, un seul échantillon est traité et tous les polypeptides du mélange sont répartis sur l'ensemble du gel (dont seule une partie est montrée ici). Les différentes bandes ou spots sont visualisées par des colorants tels que le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent. (Clichés Labo BG et MVE, Orsay).

En raison de leur organisation moléculaire et de leur charge négative, les acides nucléiques linéaires sont directement séparables en fonction de leur taille, par électrophorèse sur un gel poreux serré. La technique récente d'**électrophorèse en champ pulsé** permet la séparation de molécules d'ADN de très grande taille, allant jusqu'à des chromosomes eucaryotiques entiers ; les 16 chromosomes de la levure de bière sont ainsi obtenus individuellement, préalable indispensable à leur cartographie et à leur séquençage complets (voir *figure* 3.5).

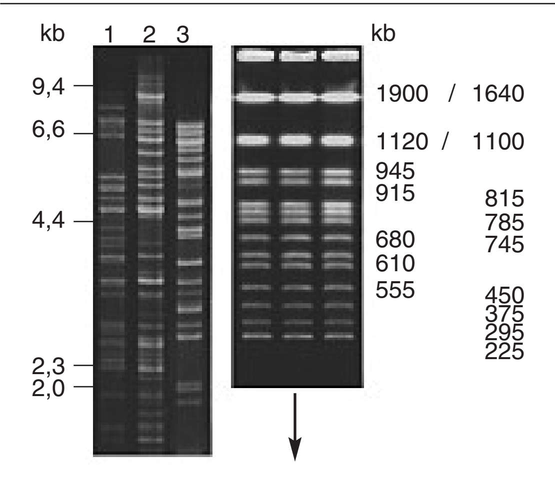


Figure 3.5

Électrophorèses monodimensionnelles d'acides nucléiques sur gels de polyacrylamide

À gauche, séparation d'échantillons d'ADNmt d'Amphibiens digérés par des enzymes de restriction.
À droite, séparation des 16 chromosomes de la levure par électrophorèse en champ pulsé.
La taille des différentes molécules d'ADN est indiquée en kb. Noter la différence considérable de résolution que permettent ces deux techniques (sens de la migration indiqué par la flèche). (Clichés Labo BG, Orsay).

1.2.2. Ultracentrifugation

La séparation de particules biologiques allant des petites macromolécules (protéines) jusqu'aux gros édifices supramoléculaires (ribosomes, Virus) peut être obtenue par cette technique. En fonction du protocole mis en œuvre, celle-ci conduit à séparer les particules selon : 1) pour l'essentiel, leur taille et leur forme, ou 2) uniquement leur densité, indépendamment de ces deux paramètres.

Les ultracentrifugeuses sont des machines très sophistiquées par rapport aux centrifugeuses classiques ; leurs rotors peuvent tourner jusqu'à près de 80 000 tours par minute, et ils fournissent des champs de gravité atteignant 500 000 fois la gravité terrestre. Dans ces conditions, et en utilisant la technique dite de **centrifugation en gradient**,

même des particules de très petite taille et présentant de très faibles différences dans leurs caractéristiques peuvent être séparées. On distingue deux types de protocoles utilisant soit des gradients préformés de saccharose, soit des gradients « autoformés » de chlorure de césium (CsCl).

• Dans la technique du **gradient préformé**, le tube à centrifuger contient une solution de saccharose ou de glycérol dont la concentration varie de façon régulière et décroissante du bas vers le haut du tube. Cette variation peut être linéaire et continue ou bien discontinue et par paliers ; dans les deux cas, la viscosité et la densité évoluent dans le même sens que la concentration. On dépose à la surface du gradient une fine couche de l'échantillon dont on veut séparer les constituants ; on centrifuge ensuite dans un rotor à godets mobiles, qui se mettent à l'horizontale lors de sa rotation, pour ne pas perturber la géométrie du système.

Comme les paramètres déterminant la vitesse de sédimentation des particules contenues dans l'échantillon évoluent au cours de leur descente le long du gradient, celles-ci se séparent efficacement et migrent en classes homogènes, formant des bandes le long du tube (**centrifugation** dite parfois **zonale**) ; la séparation est obtenue en une seule étape. Cependant, si la centrifugation se prolonge et si les particules ont une densité supérieure à celle de toutes les couches de saccharose, elles les traverseront toutes et se sédimenteront finalement au fond du tube. La durée de l'opération doit donc être contrôlée, selon ce que l'on cherche à séparer. La récolte du matériel se fait en perçant le fond du tube et en récupérant goutte à goutte le gradient dans une série de tubes (voir *figure* 3.6).

Cette technique a historiquement permis de séparer les ribosomes entiers ou leurs sous-unités, les divers ARN (m, r, t), un grand nombre de protéines ou de Virus…, et de leur attribuer un coefficient de sédimentation caractéristique. Celui-ci est proportionnel à la taille de la particule, mais la forme de cette dernière peut moduler sa valeur ; il est exprimé en unités Svedberg (S) et on parle ainsi d'ARN 18 S, 28 S, 5 S…

Cette méthode s'applique aussi aux organites cellulaires et complète efficacement la **centrifugation** dite **différentielle**, qui sera examinée plus loin. Cependant, elle ne permet de manipuler que de petits volumes de matériel biologique, et reste une **technique** essentiellement **analytique** (par opposition aux techniques préparatives).

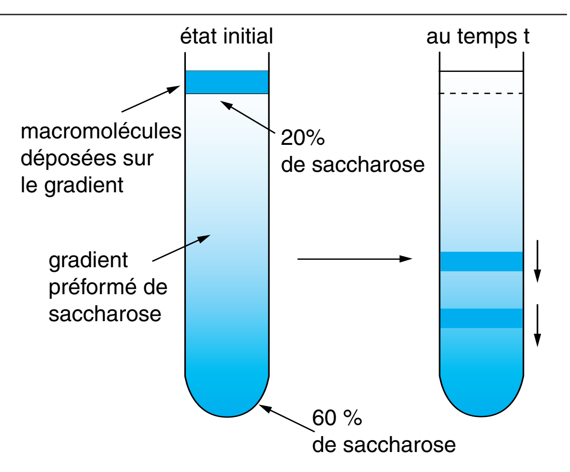


Figure 3.6

Technique de centrifugation dite du gradient de vitesse de sédimentation, dans laquelle on utilise un gradient préformé

Les particules de l'échantillon, déposé au sommet du tube, sont séparées en bandes selon leur vitesse de sédimentation. La centrifugation doit être interrompue avant que les particules n'aient atteint le fond du tube. Certaines peuvent cependant atteindre une position d'équilibre de densité après quelque temps de centrifugation.

• La technique du **gradient de densité à l'équilibre** utilise aussi, dans le tube à centrifuger, une variation continue de concentration d'un composé dont la densité décroît régulièrement du bas vers le haut. La solution constituant ce gradient est à base de saccharose (gradient préformé, comme précédemment), ou bien de CsCl (**gradient autoformé ;** voir plus loin) ; l'échantillon à analyser peut, ici aussi, être déposé à la surface du liquide. Le principe est, dans ce type d'expérience, que les particules ou les espèces moléculaires se séparent sur la base de leur seule densité. Au cours de la centrifugation, celles-ci se sédimentent jusqu'à atteindre le niveau du gradient où le liquide a exactement leur densité, et elles forment une bande. Ceci réalisé, elles ne bougent plus de cette position d'équilibre, quelle que soit la durée de la centrifugation (voir *figure* 3.7). La collecte des fractions se fait par le bas, comme précédemment.

Si l'on centrifuge très fortement une solution concentrée de CsCl (ions Cs^+ et Cl^-), les ions Cs^+, très denses, ont tendance à se sédimenter au fond du tube comme le font des particules dans l'eau. Il s'établit alors progressivement un gradient de concentration (dit autoformé), et donc un gradient de densité (voir *figure* 3.7). Si l'on part d'une solution homogène de d = 1,7, on peut obtenir en bas

du tube une d = 1,8, et en haut du tube une d = 1,6 (tous les intermédiaires de concentration existant entre ces extrêmes). Pour obtenir cela, il faut des ultracentrifugeuses fournissant des accélérations de plus de 200 000 g et tournant pendant plusieurs dizaines d'heures.

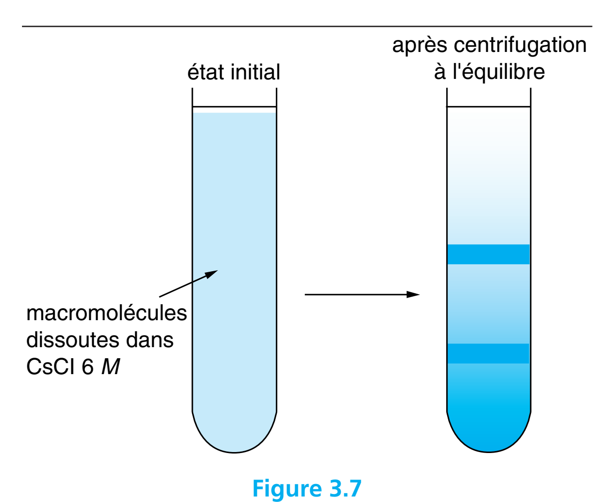


Figure 3.7
Centrifugation en gradient de densité à l'équilibre (gradient autoformé de CsCl)

L'échantillon (en général, des acides nucléiques) est au départ dissous dans la solution de CsCl au sein de laquelle s'établit, au cours de la centrifugation, un gradient continu de concentration et de densité. Les molécules se séparent en bandes selon leur seule densité et restent ainsi à l'équilibre.

Ce dernier type de gradient a été historiquement très utilisé pour la séparation des molécules d'ADN. En solution, celles-ci ont une densité qui est fonction de leur composition en bases ; bien que les différences de densité observées soient infimes, elles peuvent être discriminées par un gradient de CsCl. Après centrifugation d'une solution d'ADN en CsCl, on obtient le long du tube autant de bandes stables qu'il y a de populations de molécules d'ADN distinctes par leur **densité de flottaison**, indépendamment de leur taille (qui n'entre pas en ligne de compte dans la séparation). Par cette technique, on peut aussi séparer des ADN dont les différences de densité sont dues à la présence d'isotopes lourds (ADN contenant par exemple du ^{15}N au lieu du ^{14}N normal ; voir plus loin). Ces méthodes de centrifugation analytique de protéines ou d'acides nucléiques, abondamment utilisées dans les années 60-70, mais très lourdes, ont été supplantées par les techniques d'électrophorèse, bien plus légères et pratiques et surtout infiniment plus résolutives.

1.3. Outils et techniques cytologiques d'identification de molécules *in situ*

Les méthodes d'identification des structures cellulaires, décrites dans le chapitre 2, sont basées sur l'utilisation de colorants qui s'adsorbent sur celles-ci de manière plus ou moins élective. Seules des liaisons électrostatiques faibles, de type ionique ou hydrogène, sont responsables de l'affinité entre colorant et structure cible. Par exemple, en simplifiant, un colorant dit «basique» se fixe plutôt sur des structures «acides» ; on parle de colorants acidophiles ou basophiles. Cependant, les structures et les organites cellulaires sont en général constitués de plusieurs catégories de macromolécules ayant des propriétés très diverses, de sorte qu'on ne sait jamais quelles molécules réagissent, et selon quels mécanismes, dans ce genre de coloration.

Des techniques et des outils de plus en plus raffinés ont été mis au point, qui permettent une identification directe des constituants chimiques au niveau des structures cellulaires en place, sur des coupes ou dans des cellules entières (études dites ***in situ***). Si les méthodes les plus anciennes permettaient seulement de localiser des grands groupes de macromolécules, celles que l'on emploie à l'heure actuelle concernent des espèces moléculaires uniques. L'approche nommée **cytochimie**, qui a connu un développement important dans les années 60, a été relayée par l'**immunocytochimie** et une technique utilisant comme outils des **sondes nucléiques**, grâce auxquelles n'importe quelle protéine ou acide nucléique peut théoriquement être repérée avec précision dans la cellule, parmi des milliers d'autres.

1.3.1. Cytochimie

Dans cette approche, la spécificité de la réponse colorée est liée soit à l'utilisation de méthodes et de réactions employées en chimie organique, soit à l'utilisation d'enzymes détruisant sélectivement le composé recherché. Dans le premier cas, on caractérise des groupements fonctionnels précis, préexistants ou démasqués par un traitement approprié, tels que les fonctions alcool, aldéhyde ou cétone, amine… ; la spécificité de la détection peut donc ne pas tenir seulement au colorant mais aussi au traitement préalable que l'on fait subir aux préparations. Dans le deuxième cas, ce n'est

pas la coloration qui est spécifique, mais uniquement le traitement qui élimine le composé étudié. Deux exemples de réactions classiques, mais n'ayant plus qu'un intérêt historique, seront brièvement décrites dans les chapitres 7 et 8 ; il s'agit de la **réaction de Feulgen** (spécifique de l'ADN), et de la réaction dite à l'**APS** (mettant en évidence les polysaccharides).

Divers composés sont actuellement utilisés pour localiser des espèces macromoléculaires particulières sur des coupes ou dans des cellules entières ; bien que ces substances se fixent sur leurs cibles par des liaisons faibles, elles le font avec avec une haute affinité et une excellente spécificité. On peut citer deux colorants des noyaux, qui se fixent sur l'ADN et sont visibles par fluorescence : le **BET** (bromure d'éthidium) et le **DAPI** (diamidino-phénylindole) ; le premier s'intercale entre les plateaux de bases et le second se loge dans un des sillons externes de la molécule. Le complexe formé par l'ADN et la molécule adsorbée est fluorescent alors que les deux partenaires séparés ne le sont pas. De même, le composé nommé **calcofluor** permet de visualiser par fluorescence la cellulose contenue dans la paroi des cellules végétales.

1.3.2. Lectines

Ces composés sont largement utilisés pour mettre en évidence des motifs glucidiques de la surface cellulaire. Il s'agit de protéines ou de glycoprotéines principalement d'origine végétale et extraites initialement des graines de légumineuses (qui en sont très riches) ; des protéines ayant des propriétés équivalentes existent chez les animaux. Grâce à certains sites particuliers de leur surface, celles-ci se lient avec une grande affinité à des groupements glucidiques spécifiques : glucose, mannose, galactose, fucose, N acétyl-glucosamine…, rencontrés au niveau des glycoprotéines ou des protéoglycanes présents à la surface des cellules. De même que les anticorps (voir plus loin), les lectines peuvent être marquées par des fluorochromes ou des molécules permettant de les visualiser aisément en microscopie optique ou électronique (ferritine, peroxydase…), soit directement, soit par le biais d'une réaction enzymatique.

Les lectines servent aussi bien d'outils en cytologie, pour caractériser des protéines de surface, qu'en biochimie pour les isoler et les purifier (en tant que ligand dans une chromatographie d'affinité). La **concanavaline A** est la plus anciennement connue de ces molécules qui ont en outre la propriété d'agglutiner les cellules porteuses des résidus glucidiques qui leur sont spécifiques (d'où leur ancien nom de phytohémagglutinines). Pour cette raison, les lectines sont largement utilisées dans la caractérisation des populations cellulaires, en particulier les cellules sanguines. On a observé, à cette occasion, qu'elles stimulent la division de certains lymphocytes ; cette propriété est utilisée pour l'établissement des caryotypes (voir chapitre 12). Le rôle physiologique exact de la plupart de ces molécules, dans les cellules qui les fabriquent, reste encore inconnu.

1.3.3. Immunocytochimie

Cette technique, qui constitue une branche relativement récente de la cytologie (voir chapitre 1) permet une localisation très précise des macromolécules, à l'échelle structurale ou ultrastructurale. Comme son nom le suggère, la méthode utilise comme outils les **anticorps**, la spécificité de la reconnaissance étant basée sur la réaction immunitaire de formation des complexes antigène/anticorps. On appelle **antigène** toute molécule (en général une macromolécule : protéine, polysaccharide, acide nucléique) susceptible de provoquer, lorsqu'on l'injecte à un Mammifère, la production dans son sang de protéines spécifiques appelées anticorps (famille des immunoglobulines). Les antigènes injectés sont reconnus comme étrangers par l'organisme receveur, qui déclenche une réponse défensive au cours de laquelle les complexes antigène/anticorps seront éliminés par voie phagocytaire (*via* des globules blancs particuliers). C'est cette propriété unique de reconnaissance précise entre macromolécules qui est utilisée dans la technique immunocytochimique.

Les étapes d'obtention d'un **anticorps** antiprotéine, dit **polyclonal**, utilisable en immunocytochimie sont les suivantes :

– la protéine que l'on veut localiser doit être très soigneusement purifiée, ce qui implique un important travail biochimique préliminaire. La technique des anticorps monoclonaux simplifie ce protocole en supprimant cette étape longue et délicate (voir chapitre 11) ;
– des injections répétées de la molécule antigénique à un même animal (d'une espèce différente de celle qui a éventuellement servi à la fournir) provoquent la fabrication, par ce dernier, d'anticorps que l'on peut récupérer en prélevant le

sérum par saignée. La purification des immunoglobulines spécifiques de l'antigène est effectuée à partir de ce sérum ;

– les anticorps sont couplés par pontage covalent (non dénaturant, à l'aide de glutaraldéhyde, par exemple) à des molécules qui serviront de marqueurs permettant de les repérer facilement ; on parle alors de **conjugués**. Il peut s'agir : 1) de **fluorochromes**, c'est-à-dire de substances qui fluorescent lorsqu'on les excite avec une lumière de longueur d'onde appropriée ; 2) de protéines enzymatiques localisables grâce aux méthodes de la cytoenzymologie : phosphatase, peroxydase ; 3) de protéines de type **ferritine**, qui ont la propriété d'arrêter les électrons, en raison de leur taille importante et de la présence de fer ; 4) de petite billes d'**or colloïdal**, de quelques nanomètres de diamètre, opaques aux électrons. La première de ces méthodes, nommée **immunofluorescence**, est utilisée en microscopie photonique seulement ; les trois autres s'appliquent à la microscopie photonique ou électronique (2) ou à la microscopie électronique seule (3 et 4).

Le matériel biologique utilisé est constitué de coupes histologiques ou de cellules entières, qui sont mises en contact avec les anticorps marqués en solution dans un tampon adéquat. La formation du **complexe anticorps/antigène** ne peut évidemment s'effectuer que si un contact physique est possible entre les deux partenaires. Ceci ne pose pas de problèmes dans le cas des coupes mais devient difficile avec des cellules entières, en raison de la présence de la membrane plasmique et de la taille importante des complexes macromoléculaires manipulés. Il est possible, bien que délicat, d'injecter des anticorps marqués dans des cellules vivantes et de suivre les événements *in vivo*. De façon habituelle, les cellules entières préalablement fixées sont perméabilisées par des détergents doux ou des solvants organiques qui font des « pores » dans la membrane plasmique sans détruire l'organisation et les structures cellulaires ; ce traitement résout les problèmes d'accessibilité des anticorps greffés.

Lorsque la reconnaissance antigène/anticorps marqué a eu lieu, le matériel doit être soigneusement lavé pour éliminer les excédents d'anticorps non fixé et éviter un signal non spécifique.

La dernière étape consiste dans la visualisation des complexes ainsi formés ; selon le type de marquage des anticorps, on procède à une observation directe de la fluorescence ou des particules de ferritine ou d'or colloïdal, mais on peut aussi mettre en œuvre sur les coupes la réaction enzymatique permettant de repérer les enzymes-marqueurs (voir *figure* 3.8).

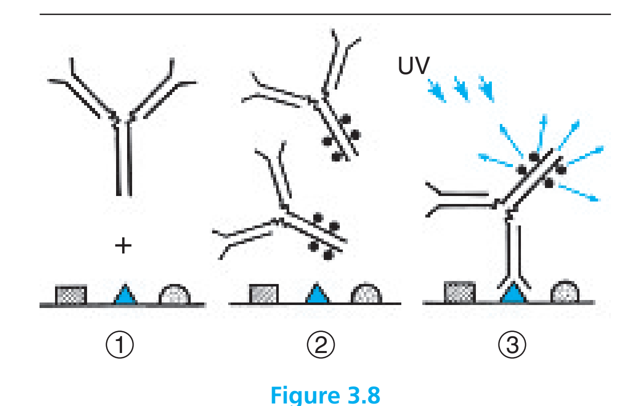


Figure 3.8

Principe de l'immunocytochimie directe

L'antigène cible (triangle coloré), au sein d'une coupe ou d'une cellule entière **(1)**, est spécifiquement reconnu par l'anticorps correspondant, auquel a été greffé, selon les cas, une enzyme, de la ferritine, de l'or colloïdal ou un fluorochrome **(2)**. L'exemple de l'immunofluorescence **(3)** est illustré ici.

Cette technique déjà ancienne, utilisant un seul anticorps marqué, porte le nom d'**immunocytochimie directe ;** une version plus récente de ce protocole, tout aussi spécifique, mais plus sensible : l'**immunocytochimie indirecte**, sera décrite plus loin. Celle-ci a connu un développement important dans le cadre de l'étude des structures constituant le cytosquelette des cellules eucaryotiques. La microscopie confocale, qui permet l'étude d'objets transparents épais et fournit cependant des images en fluorescence d'une exceptionnelle lisibilité, représente le dernier progrès associé à cette technique (voir chapitre 11).

1.3.4. Hybridation *in situ* (sondes nucléiques)

De même que l'immunocytochimie permet de localiser des protéines au sein des structures cellulaires, la technique dite d'**hybridation *in situ*** permet de repérer des séquences particulières d'acides nucléiques en place. Cette méthode est basée sur la propriété bien connue, que présentent ces molécules, de reconstituer des hybrides double-brins stables, après avoir subi une dénaturation préalable. Lorsque l'on dispose d'une séquence donnée d'ADN ou d'ARN en quantité suffisante, on peut utiliser celle-ci comme **sonde** pour mettre en évi-

dence une séquence homologue dans une structure, de la même façon que les biologistes moléculaires détectent des séquences sur des filtres résultant du transfert de gels d'électrophorèse. Les sondes simple-brin sont marquées *in vitro* soit radioactivement, soit chimiquement, par des protocoles appropriés ; il existe des sondes dites «froides», détectables de différentes manières, y compris immunologiquement.

L'ADN ou l'ARN cibles étant inclus dans les cellules entières fixées, dans des coupes ou des écrasements, ils doivent d'abord être rendus accessibles à la sonde par perméabilisation ou protéolyse ménagées. Après dénaturation *in situ*, dans le cas de l'ADN, la sonde marquée est mise en contact avec la cible simple-brin dans des conditions où les hybrides peuvent se reconstituer. Après de nombreux rinçages destinés à éliminer les molécules simple-brin appariées de manière peu spécifique, la visualisation des hybrides obtenus est effectuée, soit par autoradiographie, soit par la méthode de coloration propre à chaque sonde froide (voir *figure* 3.9). Lorsque la sonde est marquée par un fluorochrome et que les hybrides sont détectés par fluorescence, la technique porte le nom de FISH («fluorescence *in situ* hybridization»). Cette technique puissante conduit à localiser aussi bien des ARN spécifiques dans le cytoplasme que des gènes le long des chromosomes. Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'expression différentielle des gènes dans les tissus et elle offre à ce titre des applications très intéressantes dans le domaine du développement embryonnaire.

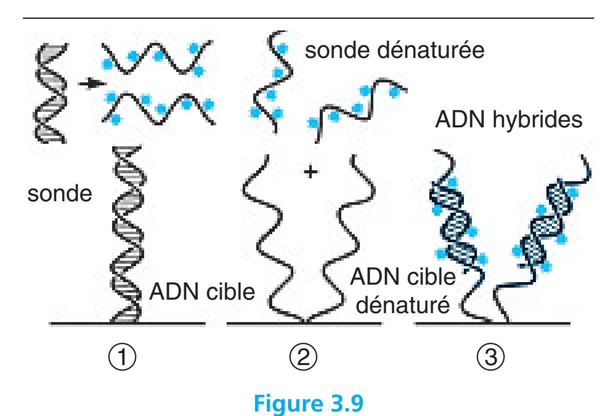


Figure 3.9

Principe de l'hybridation *in situ*

L'acide nucléique cible (ici un ADN dénaturé) au sein d'une cellule entière, d'une coupe ou d'un écrasement **(1)**, est reconnu par une sonde complémentaire simple-brin marquée radioactivement ou chimiquement **(2)**. La détection des hybrides stables **(3)** utilise respectivement l'autoradiographie ou bien des techniques spécifiques des sondes dites «froides».

1.4. Fractionnement cellulaire

Depuis les travaux de Claude (au cours des années 1940), il existe une approche qui combine les avantages de l'analyse biochimique et les exigences d'une biologie cellulaire soucieuse des structures, ne considérant pas les cellules eucaryotiques comme de simples sacs d'enzymes. Le fractionnement cellulaire vise, après avoir détruit la membrane cytoplasmique et désorganisé la cellule de façon suffisamment douce, à séparer les organites les uns des autres et à les obtenir aussi purs que possible dans des tubes à essais distincts. Cette technique ouvre des possibilités expérimentales considérables, tant au plan de la biochimie : identification des molécules propres aux organites, qu'à celui de l'étude des fonctions qu'ils assurent. Ces fonctions peuvent alors être analysées ***in vitro*** de façon plus simple que lorsque les organites font partie de l'ensemble hautement intégré que représente la cellule, sachant que cette dimension devra tout de même être finalement retrouvée.

Cette technique s'applique à des populations cellulaires aussi homogènes que possible : tissus animaux ou végétaux (foie, muscle, feuilles…), cultures de cellules ou de micro-organismes… Elle implique deux étapes : le broyage des cellules, ou **homogénéisation**, qui dissocie les organites et les suspend dans un milieu approprié, et la séparation des organites en fractions pures, au moyen de **centrifugations**.

1.4.1. Homogénéisation

Cette première étape, qui conduit à un **homogénat**, doit conserver autant que possible l'intégrité structurale, biochimique et physiologique des organites des cellules étudiées. Les détériorations pouvant survenir au cours du broyage sont d'ordre mécanique, chimique ou osmotique ; les milieux et les méthodes de broyage doivent en tenir compte. Les méthodes d'homogénéisation sont de type : 1) mécanique : pistons et cylindres plus ou moins serrés, ou mixers, 2) physique : hautes pressions ou ultra-sons, ou 3) chimique :

destruction des membranes par des détergents et des parois (cas des cellules végétales ou des bactéries) par des enzymes appropriées (cellulases, lysozyme…).

Les milieux de broyage répondent à des exigences chimiques et osmotiques : leur pH est neutre et leur composition ionique aussi voisine que possible de celle du cytoplasme. Ils sont en outre tamponnés, car la destruction de la structure cellulaire peut conduire à la libération de produits ou à des réactions chimiques artefactuelles, susceptibles de faire varier le pH de l'homogénat. Ils sont enfin osmotiquement équilibrés car de nombreux organites ou vésicules se comportent comme des «sacs» sensibles à la pression osmotique du milieu aqueux environnant ; leur volume doit rester constant au cours de l'expérience, ce qui semble être une garantie de leur intégrité. On considère qu'une solution de saccharose 0,25 M est isotonique vis-à-vis de la plupart des organites.

Selon la catégorie d'organites que l'on cherche à purifier, la nature et la concentration des ions contenus dans le milieu varient car elles déterminent de façon importante la structure et les propriétés physiologiques des organites isolés. Il n'existe pas de milieu général d'homogénéisation ; chaque type d'organite exige un protocole spécifique établi après de nombreux tâtonnements, et qui diffère selon l'étude envisagée. Les conditions générales du broyage doivent enfin limiter les dégradations enzymatiques liées, par exemple, à la destruction de certains organites tels que les lysosomes, qui libèrent alors des hydrolases, ou les phénomènes d'oxydation par voie enzymatique, particulièrement chez les Végétaux, riches en phénols. Le broyage, ainsi que les opérations suivantes, sont donc effectués à basse température (0-4 °C), et le plus rapidement possible.

1.4.2. Séparation des différentes catégories d'organites et structures cellulaires

Les différentes classes d'organites se distinguent par leur taille, leur forme et leur densité ; les variations des deux premiers paramètres peuvent être très grandes (les noyaux atteignent 10 µm de diamètre tandis que les ribosomes mesurent 15-20 nm) alors que celles relatives à la densité restent faibles (de 1,1 environ pour les mitochondries, les lysosomes ou les peroxysomes, à 1,6 pour les ribosomes). Dans le champ de gravité terrestre, ces organites ou structures restent spontanément en suspension au sein de l'homogénat et on n'obtient aucune séparation en fractions distinctes.

Si l'on augmente artificiellement la valeur de ce champ par centrifugation, ces particules se sédimentent avec une vitesse accrue et différente selon leurs caractéristiques hydrodynamiques, de sorte que l'on peut fractionner l'homogénat. Le principal paramètre déterminant la vitesse de sédimentation est la masse, de sorte que les particules les plus grosses et les plus denses de l'homogénat forment le premier sédiment (ou **culot**) rassemblé au fond du tube à centrifuger, le liquide surnageant contenant les plus petites et les plus légères. Le **surnageant** et le culot sont séparés par décantation ; ce dernier peut être resuspendu dans un nouveau milieu, tandis que le surnageant peut être soumis à une autre centrifugation qui sédimentera les particules encore en suspension.

Encart technique

La centrifugation différentielle

Grâce à une série de centrifugations de plus en plus longues et donnant des champs de gravité de plus en plus élevés, on fractionne l'extrait initial en une série de culots et de surnageants. On a déterminé de façon empirique les durées et les valeurs des champs (c'est-à-dire les vitesses de rotation, pour un rotor donné) de façon à séparer les principales catégories d'organites. Schématiquement, on peut donner les ordres de grandeur suivants pour un protocole de fractionnement cellulaire de tissu animal (voir *figure* 3.10) ; conditions pour obtenir, sous forme de culot :

– gros débris et cellules entières : 5 minutes à 100 g ;
– noyaux : 10 minutes à 1 000 g ;
– mitochondries et lysosomes : 15 minutes à 10 000 g ;
– débris membranaires et microsomes : 1 heure à 100 000 g ;
– ribosomes : 10 heures à 100 000 g.

Grâce à cette méthode, on peut obtenir rapidement des fractions relativement pures d'organites en quantités importantes ; on parle de **technique préparative**. Il faut cependant noter que les sédi-

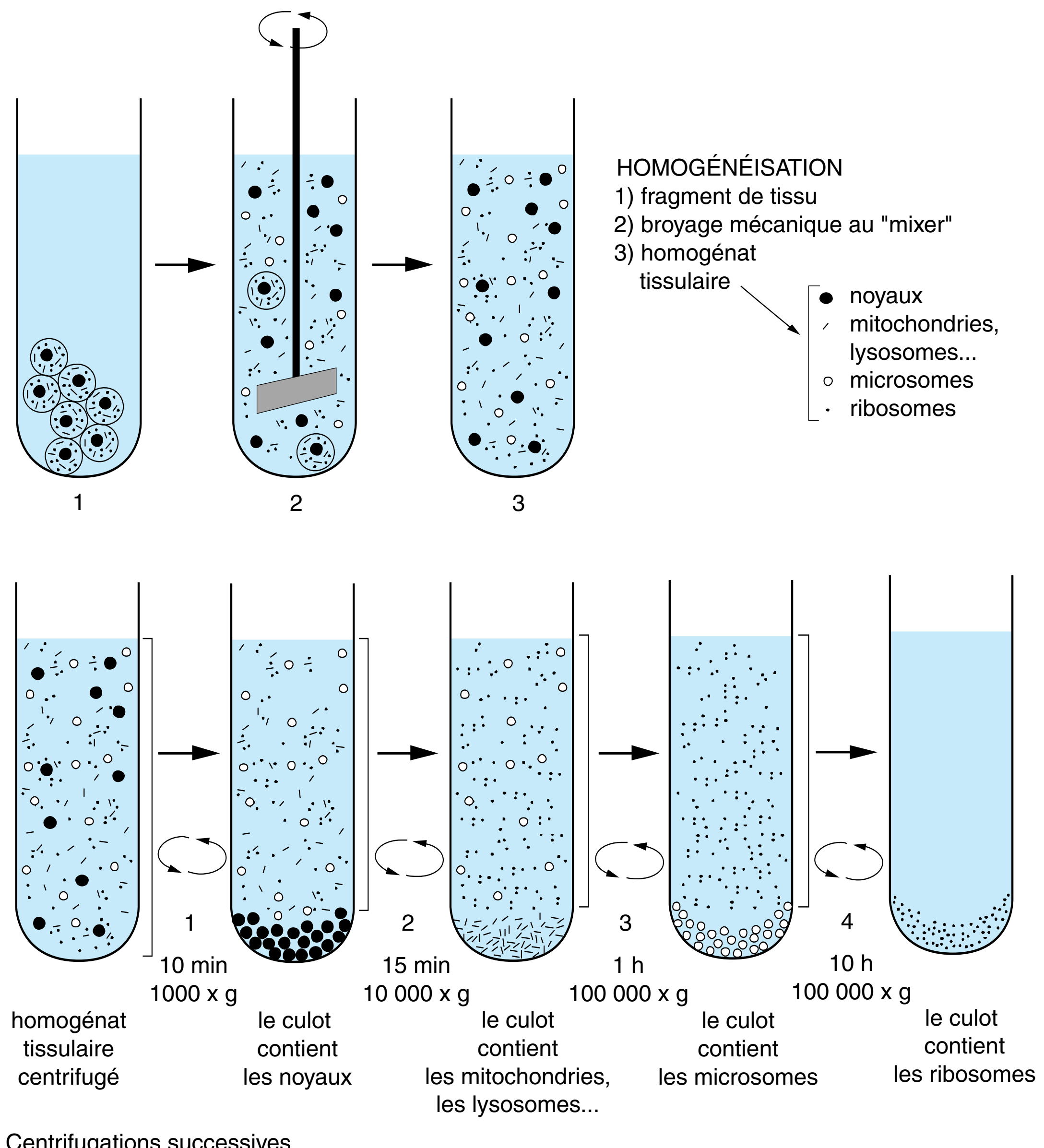


Figure 3.10

Protocole de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

L'homogénat initial obtenu à partir d'un fragment de tissu **(1 à 3)** est fractionné, par 4 centrifugations de plus en plus fortes, en une série de 4 sédiments contenant des organites ou des particules de masse de plus en plus faible, et un surnageant final à partir duquel plus rien ne peut être sédimenté. Les microsomes (culot 3) sont de petites vésicules provenant de la fragmentation de certains systèmes membranaires de la cellule au cours de l'homogénéisation.

ments obtenus ne sont pas parfaitement purs d'emblée car ils sont toujours contaminés par des éléments appartenant au surnageant ; on doit donc « laver » les culots, soit en les resuspendant dans un milieu neuf et en les recentrifugeant plusieurs fois, soit en les soumettant à un gradient de saccharose qui donne, en une seule étape, des fractions d'une grande pureté (voir plus haut).

1.4.3. Problèmes rencontrés au cours du fractionnement cellulaire

La mise en œuvre de ces expériences présente quelques difficultés et les résultats obtenus doivent être contrôlés et confirmés par des approches convergentes. La méthode décrite est très efficace pour des organites compacts, globulaires ou vésiculaires : noyaux, chloroplastes, mitochondries… En revanche, des structures membranaires dont la géométrie est complexe, telles que le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, sont évidemment difficiles à isoler dans de bonnes conditions. De fait, toutes ces membranes sont déchirées lors de l'homogénéisation et leurs lambeaux se referment spontanément sur eux-mêmes pour donner de minuscules vésicules nommées **microsomes**. Ces derniers sont récupérés par centrifugation d'un surnageant post-mitochondrial et séparés en plusieurs catégories (microsomes lisses et rugueux) sur gradient de saccharose (voir chapitre 9).

Après de nombreux tâtonnements, on a cependant pu isoler des structures «sophistiquées» comme des bordures en brosse d'entérocytes, des dictyosomes golgiens, des infraciliatures de cellules ciliées… Par ailleurs, certains organites sédimentent à des vitesses tellement voisines qu'ils sont très difficiles à séparer en une seule opération : c'est le cas des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes, dont l'identité enzymatique n'a pas été aisée à établir. Il faut alors combiner judicieusement les centrifugations différentielles et en gradient de saccharose.

Les organites isolés par ces techniques doivent au minimum conserver l'aspect et la taille vus sur le vivant, toute modification de structure relevant vraisemblablement de l'artefact. Ceci justifie des contrôles cytologiques constants au cours de la mise au point d'un protocole particulier de fractionnement cellulaire. Mais à côté des artefacts de type structural, il en existe d'ordre physiologique, qui sont plus difficiles à déceler : tout organite séparé de son contexte modifie presque inévitablement son métabolisme. Très souvent aussi, des organites endommagés au cours de l'homogénéisation perdent des enzymes qui peuvent aller s'adsorber sur d'autres, les «contaminer» et ainsi modifier leurs propriétés.

Lorsqu'une fraction est obtenue, son degré de pureté doit être vérifié ; ce contrôle est cytologique ou physiologique. En raison de la taille des structures analysées, la microscopie électronique est souvent la seule méthode fiable. Quand la connaissance du type cellulaire est assez poussée, des contrôles biochimiques sont possibles ; certains organites sont en effet caractérisés par des activités enzymatiques spécifiques, qui servent de **marqueurs** d'identité. Ainsi, la succinodéshydrogénase est un marqueur des mitochondries, comme diverses glycosidases sont des marqueurs des saccules golgiens, ou certaines phosphatases acides, des lysosomes. On peut alors estimer le degré de contamination d'une fraction par un simple dosage (voir chapitre 7).

1.5. Observation directe des macromolécules et des édifices supramoléculaires

Elle est possible grâce à la mise en œuvre de deux techniques : la **coloration négative** et l'**ombrage métallique**, qui s'appliquent à des objets de petites dimensions et de forme relativement simple, tels que des éléments cellulaires isolés : organites, fragments d'organites, Virus ou bien molécules. La première permet de voir, en microscopie électronique à transmission, de très fins détails que les coupes ne parviennent pas à visualiser, en particulier dans le cas des structures fibreuses (flagelles bactériens, microtubules, molécules de collagène…). Le principe de l'ombrage métallique est un peu différent et les images obtenues sont sensiblement plus empâtées que dans le cas précédent. Il permet, en particulier, de visualiser simplement les molécules d'acides nucléiques ; il constitue également une étape dans le protocole de cryofracture (voir chapitre 5). La **microscopie** dite **à effet tunnel** constitue la dernière née de ces techniques de visualisation de molécules, mais ses applications en biologie restent encore modestes.

1.5.1. Coloration négative

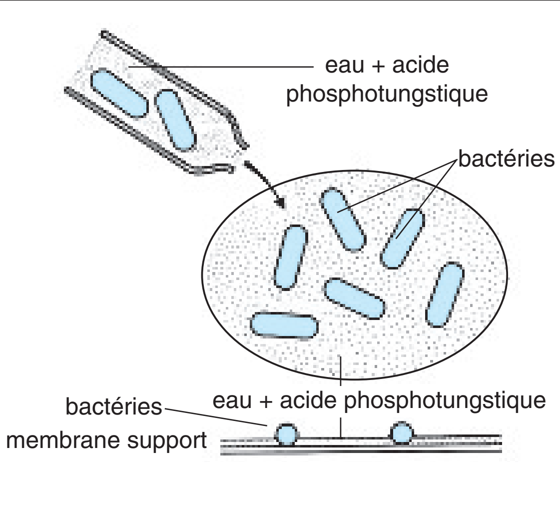
Le principe de la méthode est simple. Les particules à observer sont mises en suspension dans un composé, ou «colorant», en solution aqueuse, et ayant les propriétés suivantes : 1) grande solubilité, afin d'obtenir une concentration élevée, 2) opacité aux électrons une fois l'eau évaporée, 3) absence de formation de cristaux au séchage (structure amorphe), et 4) stabilité au bombardement électronique.

On utilise en général l'acide phosphotungstique dissous dans l'eau ; les particules suspendues dans cette solution sont déposées sur des grilles de

cuivre préalablement recouvertes d'un fin film de carbone, puis mises à sécher. Le «colorant» s'accumule autour des particules, créant une couche opaque aux électrons ; on obtient ainsi une coloration de fond sur laquelle les objets à observer (si possible disposés en une couche monoparticulaire) se détachent en clair. De très forts grandissements sont autorisés, de sorte que l'on voit même aisément la forme des molécules de protéines avec cette méthode. C'est une technique de mise en œuvre rapide et facile, particulièrement utilisée par les virologistes (voir *figure* 3.11 et chapitre 15).

1.5.2. Ombrage métallique

Les molécules ou les particules, dissoutes ou suspendues dans l'eau, sont directement étalées à la surface d'une grille carbonée pour la microscopie électronique. Le léger relief présenté par ces particules après évaporation de l'eau est artificiellement accentué par vaporisation d'une très fine couche métallique (or ou platine), à la surface de la préparation. L'opération se déroule dans une cloche où un vide poussé a été fait ; la projection de métal est réalisée sous un angle assez incliné



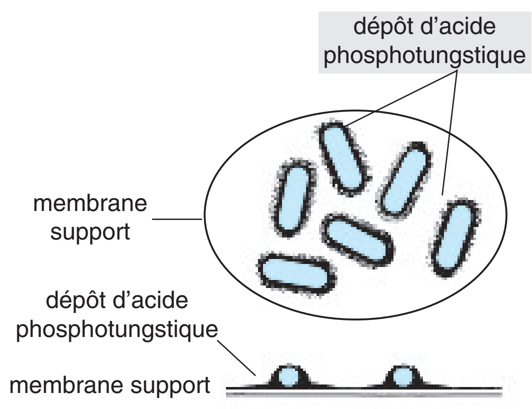


Figure 3.11

Principe de la coloration négative

Après évaporation du solvant contenant le «colorant» et accumulation de ce dernier autour des particules ou des cellules déposées sur une membrane-support, on obtient un effet de halo permettant de voir ces particules en négatif, en microscopie électronique.
(D'après A. Berkaloff et al. ; Biologie et physiologie cellulaire, Hermann).

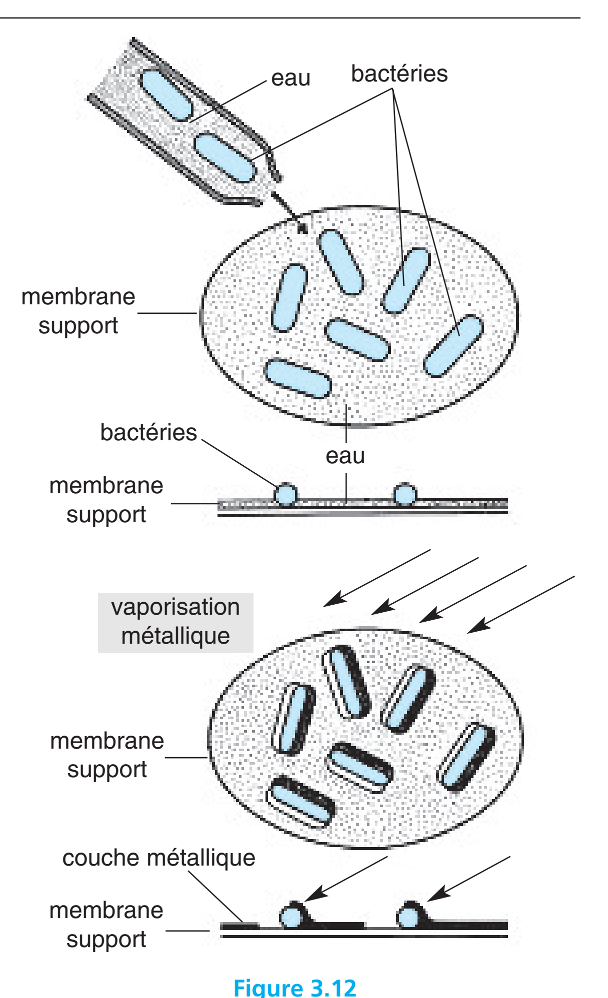


Figure 3.12

Principe de l'ombrage métallique

Après évaporation du solvant contenant les particules ou les cellules en suspension, celles-ci sont déposées sur une membrane-support. On procède ensuite à une opération de vaporisation métallique latérale sous vide ; celle-ci conduit à une accumulation localisée de métal qui créera un effet «d'ombre portée» lors de l'examen en microscopie électronique.

par rapport au plan de la grille. Comme pour la coloration négative, le métal déposé autour des objets fait obstacle aux électrons et on a une vision directe «en négatif» ; on observe en fait une ombre portée de l'objet, ce qui augmente la sensation de relief (voir *figure* 3.12). Cette technique s'est avérée indispensable pour la visualisation des ADN et des ARN (voir *figures* 4.18 et 15.1) ; elle est également utilisée dans l'étude des surfaces (cryofracture).

1.5.3. Microscopie à champ proche (à effet tunnel)

Contrairement aux techniques de microscopie classiques utilisant des radiations pour observer un objet, cette méthode très récente, qui permet seulement d'analyser des surfaces, met en jeu un phénomène particulier d'interactions entre celles-ci et un objet se déplaçant à proximité immédiate. Lorsqu'une pointe de tungstène extrêmement fine (terminée par un seul atome) est approchée à une distance de l'ordre du nm d'une surface conductrice, un faible courant électrique (nommé courant-tunnel) passe entre les deux, si une différence de potentiel existe à leur niveau. Le mouvement de la pointe est contrôlable verticalement, sur une fraction de nanomètre, et latéralement par des dispositifs dits de «nanodéplacements» (obtenus à l'aide de céramiques piézoélectriques).

Le balayage assuré par la pointe, ou sonde, est tel que le courant reste constant (et donc la distance entre les deux objets), de sorte que ses déplacements reconstituent avec une grande précision les irrégularités de la surface étudiée. On obtient ainsi une cartographie très fine des objets (résolution inférieure à 0,5 nm), mais évidemment sur des surfaces peu importantes. En biologie, la technique reste réservée à l'analyse de molécules ou d'édifices supramoléculaires isolés ; cependant, ses utilisations sont nombreuses en physique, en particulier en microélectronique.

2. OUTILS ET TECHNIQUES D'ANALYSE DU FONCTIONNEMENT CELLULAIRE

La **physiologie cellulaire** étudie le fonctionnement des cellules de la manière la plus intégrative possible, et nous ne pas parlerons donc pas ici des techniques de dosages enzymatiques simples, qui relèvent de la biochimie pure. Seules seront décrites les principales méthodes permettant d'analyser *in vitro* ou *in vivo* les fonctions d'organites purifiés ou de cellules entières.

2.1. Cultures de cellules

Des cultures clonales de diverses cellules isolées sont réalisables ; elles présentent l'avantage considérable de constituer des populations génétiquement et physiologiquement homogènes. Selon les cas, ces cellules peuvent croître en suspension ou adhérer sur un support (tapis cellulaire) ; dans le premier cas, elles sont récupérées par centrifugation, dans le deuxième, il faut les décrocher par voie mécanique (grattage) ou chimique pour pouvoir les étudier.

Les micro-organismes procaryotiques (Bactéries, Cyanobactéries…) ou eucaryotiques unicellulaires (Protistes : *Amoeba*, *Paramecium*, *Tetrahymena*…, Algues : *Chlamydomonas, Chlorella, Micrasterias*… ou Champignons : levure de bière…) se cultivent aisément, dans des milieux synthétiques spécifiques parfaitement contrôlés et dans des conditions généralement simples. Ces milieux sont liquides ou solides, après gélification au moyen de composés inertes tels que l'agar-agar. La culture *in vitro* de cellules d'organismes supérieurs, animaux ou végétaux, pose davantage de problèmes dans la mesure où, contrairement aux précédentes, ces cellules sont normalement intégrées au sein d'un organisme et donc le plus souvent tributaires, pour leur croissance, d'interactions avec d'autres cellules. L'intérêt de telles cultures est considérable car elles constituent des systèmes très simplifiés par rapport aux autres sources de cellules disponibles à partir de ces mêmes organismes.

Les milieux usuels de culture de cellules animales, dont l'origine remonte au début du siècle (Roux, 1885 ; Harrison, 1909 et Carrel, 1913), sont à base de solutions salines additionnées d'un grand nombre de molécules organiques : sucres, acides aminés, vitamines…, en raison de leur caractère hétérotrophe. Ils doivent aussi contenir des extraits de sérum sanguin (de veau, par exemple), qui apportent en très faible concentration des facteurs de croissance indispensables à la multiplication cellulaire (voir chapitre 13). Des

milieux totalement synthétiques et contenant de tels facteurs purifiés en concentrations contrôlées sont disponibles depuis 1965 (voir *figure* 3.13).

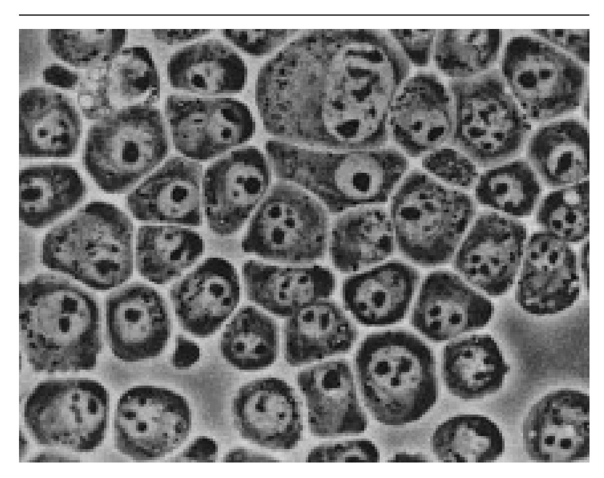


Figure 3.13
Cellules animales en culture : cellules tumorales de souris (Cliché Labo BG, Orsay).

Les cellules cultivées *in vitro* conservent le plus souvent certaines caractéristiques différenciées de leur tissu d'origine, ou bien une aptitude à se différencier dans des conditions expérimentales appropriées, ce qui autorise l'étude cellulaire et moléculaire des processus de différenciation. Plusieurs modèles animaux sont ainsi abondamment exploités : cellules souches sanguines, cellules embryonnaires musculaires ou nerveuses…, respectivement pour l'analyse de l'hématopoïèse, de la myogenèse ou de la différenciation neuronale. Il existe divers procédés (chimiques, ou utilisant des Virus dits « fusionnants ») permettant de faire fusionner entre elles des cellules en culture de même origine ou d'origine systématique différente. Ces cellules hybrides, renfermant deux ou plusieurs noyaux distincts au sein d'un seul cytoplasme mixte, sont appelées **hétérocaryons ;** leur utilisation s'est avérée très importante en physiologie cellulaire ou en génétique (voir plus loin).

Les cellules végétales peuvent aussi se multiplier *in vitro*, à l'état de cellules isolées en suspension, mais également sous forme de massifs cellulaires plus ou moins compacts appelés **cals** (voir *figure* 3.14). En jouant sur la concentration ou la nature des facteurs de croissance ajoutés au milieu (auxines, cytokinines…), l'expérimentateur peut, à volonté, induire à partir d'un cal indifférencié et inorganisé une différenciation et une organogenèse précises : formation de racines, de tiges feuillées ou de fleurs. La régénération complète d'une plante entière est ainsi possible à partir d'une cellule unique (voir chapitre 14).

ENCART TECHNIQUE

Les cultures de cellules animales

On distingue :

– des **cultures primaires**, qui résultent simplement de la multiplication de cellules (souvent de nature embryonnaire) prélevées directement dans les organismes, après que leurs tissus aient été dissociés par des enzymes appropriées (protéases) ;

– des **cultures secondaires**, qui résultent du repiquage de cellules issues de cultures primaires, après dilution et ensemencement dans du milieu nutritif neuf. Ces cultures sont à terme condamnées à mourir, comme celles de l'organisme de départ, après environ 50 à 100 divisions ; on parle de **souches cellulaires** ;

– des **lignées cellulaires**, qui dérivent des précédentes après que certaines cellules particulières de la population aient acquis la propriété de se multiplier indéfiniment et aient été sélectionnées par l'expérimentateur. Ces cellules immortelles sont donc, par définition, anormales et elles résultent de mutations spontanées (ponctuelles ou réarrangements chromosomiques). Les lignées de ce type sont relativement faciles à obtenir chez les rongeurs (lignées dites 3T3) ; ce n'est pas le cas pour les lignées d'origine humaine. Elles peuvent être aussi artificiellement obtenues grâce à des agents chimiques ou physiques mutagènes, par des Virus ou bien par des manipulations génétiques (transfection d'ADN purifié). Parmi les lignées cellulaires immortalisées, on distingue enfin des **lignées** dites **transformées**, qui induisent des tumeurs si on injecte leurs cellules à des animaux sains. La plus connue des lignées entretenues en culture est la lignée HeLa, d'origine humaine (carcinome du col de l'utérus), cultivée depuis 1952 et universellement utilisée.

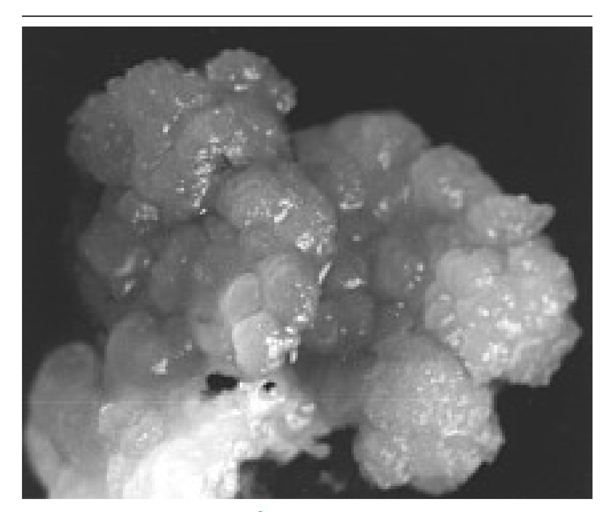


Figure 3.14
Cellules végétales en culture : cal de cellules de bananier (Cliché Labo MVE, Orsay).

2.2. Expériences de marquage radioactif in vivo

2.2.1. Rappels sur les isotopes

Les différents éléments rencontrés dans la nature ne sont pas des populations homogènes d'atomes ; ce sont des mélanges d'**isotopes** (atomes ayant un même nombre d'électrons mais un noyau de masse différente). À côté des éléments les plus courants : ^{1}H, ^{12}C, ^{14}N, ^{16}O…, on distingue les isotopes rares stables : ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O…, et les radio-isotopes : ^{3}H, ^{14}C… Les noyaux de ces derniers présentent un rapport protons/neutrons déséquilibré, et des redistributions spontanées de particules se produisent de façon qu'un état plus stable soit trouvé. Ceci s'accompagne d'émissions de particules chargées ou de radiations : on parle de désintégration du noyau, c'est le phénomène de **radioactivité**.

La radioactivité des atomes constituant la matière vivante est due essentiellement à l'émission d'électrons négatifs (particules β^-). Ceux-ci possèdent une énergie cinétique variant de façon continue et comprise entre deux valeurs extrêmes spécifiques de l'élément qui se désintègre. Chaque radio-isotope est caractérisé par trois paramètres : 1) le type d'émission, 2) la période ou **demi-vie**, temps nécessaire pour que la moitié des atomes radioactifs se désintègre, et 3) l'énergie moyenne de l'émission (exprimée en Méga Électrons Volts, ou MEV). L'**activité spécifique** d'un échantillon radioactif est définie par le rapport : désintégrations par minute (dpm)/masse de l'échantillon exprimée en grammes ou moles. L'unité de radioactivité est le becquerel, qui correspond à une transformation nucléaire (désintégration) par seconde.

Les principaux radio-isotopes employés en biologie ou physiologie cellulaire sont : ^{3}H - ^{14}C - ^{32}P - ^{35}S - ^{22}Na - ^{42}K - ^{125}I. On les utilise sous forme de molécules minérales ou organiques dans lesquelles un ou plusieurs atomes sont radioactifs ; celles-ci ne sont pas chimiquement distinguées des autres par les cellules et sont parfaitement assimilées (absorbées, métabolisées et incorporées dans leur propre matière). Si l'on a les moyens de déceler la présence de l'isotope, on pourra suivre son cheminement dans la cellule ou l'organisme ; la molécule agit donc comme un « espion ». Ceci implique évidemment que l'on puisse :

- soit suivre la molécule-traceur dans l'organisme sans avoir à le détruire : isotopes à émissions très pénétrantes faciles à déceler de l'extérieur ;
- soit localiser l'isotope sur des préparations histologiques (voir plus loin la technique d'autoradiographie) ;
- soit fractionner la cellule en espèces moléculaires pures ou en classes d'organites purs.

Les isotopes naturels lourds, comme le ^{15}N ou le ^{13}C, ont été employés en biologie moléculaire (expériences classiques de Meselson et Stahl relatives à la réplication semi-conservative de l'ADN, en 1958) ; leur utilisation nécessite la technique de l'ultracentrifugation en gradient de densité de CsCl, qui est relativement lourde et de moins en moins employée. Ces isotopes présentent par contre un intérêt considérable pour l'étude des grands cycles des éléments au sein de la biosphère. Ils constituent en effet des traceurs naturels et enregistrent l'origine et l'histoire des molécules organiques présentes dans les cellules des Végétaux ou des Animaux, à travers leur composition isotopique. La biogéochimie isotopique décrit la dynamique actuelle des éléments mais elle reconstitue aussi les paléo-environnements. Son outil principal est le spectromètre de masse, qui sépare les différents isotopes les uns des autres et les quantifie.

2.2.2. Utilisation des précurseurs marqués par des radio-isotopes

Les principales utilisations se classent schématiquement en deux rubriques.

• Analyse des échanges, transports et accumulations, en général sans transformation, des ions ou molécules marquées. Ceux-ci s'étudient au niveau de l'organisme entier ou de la cellule ; par exemple : 1) étude de la circulation sanguine, de l'excrétion urinaire ; accumulation du ^{32}P au niveau des tumeurs, de ^{131}I au niveau de la thyroïde…, 2) étude des échanges de Na^+ et K^+…, à travers la membrane plasmique, 3) étude des transports intracellulaires au cours des processus sécrétoires ou des transferts d'information d'un compartiment à un autre.

• Analyse des transformations biochimiques. Si l'analyse chimique permet d'établir un catalogue précis des constituants cellulaires (concentrations, répartitions), elle ne donne qu'une vision statique des phénomènes biologiques. Grâce aux précurseurs marqués, il est possible d'étudier les interconversions et les filiations des métabolites ; par exemple, si l'on donne un tel précurseur à des cellules, on retrouvera plus tard de nombreux métabolites marqués, nécessairement issus de celui-ci (expériences de ***pulse-chase*** **;** voir plus loin).

On trouve dans le commerce un grand nombre de molécules marquées de façon précise. Celles-ci sont ajoutées au milieu de culture mais, dans le cas de difficultés de pénétration, on peut les injecter directement dans les cellules (ce qui permet d'ailleurs de mieux contrôler les quantités d'isotopes absorbées). La micro-injection, longtemps réservée aux cellules géantes (ovocytes d'Amphibiens, par exemple) se pratique actuellement dans tous les types de cellules en culture. Il suffit en général de fournir les radio-isotopes à l'état de traces et pendant des temps très courts (appelés *pulses*), car les méthodes de détection sont très sensibles ; de plus, il ne faut pas oublier la toxicité des isotopes à forte dose à cause des phénomènes d'ionisation de la matière vivante. On les donne en fait aux cellules sous forme de sels (Na^+, K^+, Ca^{2+}), de molécules minérales simples (CO_2) ou organiques (précurseurs de macromolécules : sucres, bases ou acides aminés).

2.2.3. Principe et intérêt des expériences de *pulse-chase*

Comme leur nom l'indique, ces expériences sont conduites en deux temps.

• Le ***pulse*** : des cellules vivantes sont soumises, dans un milieu de survie approprié, à un traitement de courte durée destiné à marquer spécifiquement certaines de leurs molécules. On fournit donc aux cellules un composé assimilable fortement radiomarqué servant de précurseur métabolique. Un acide aminé radioactif, par exemple, s'incorporera dans les protéines qui seront alors marquées. La durée du *pulse* doit être brève, comparée à celle des phénomènes que l'on étudie (de quelques secondes à quelques heures).

• La **chasse** (*chase*) est une période de « poursuite » des seules molécules marquées lors du *pulse*. Après le marquage, les cellules vivantes sont conservées pendant un certain temps dans le même milieu de survie dépourvu du précurseur marqué, ce qui nécessite auparavant de nombreux lavages. Au cours de cette période, le métabolisme cellulaire suit son cours normal et les molécules marquées sont engagées dans les processus de transport et/ou les transformations chimiques habituels.

L'intérêt évident de cette opération est que, si l'on est capable de repérer aisément les molécules marquées (ou leurs dérivés) dans des extraits ou des fractions purifiées par fractionnement cellulaire, ou bien dans des structures précises, on pourra suivre l'évolution des processus biochimiques et biologiques sur des échantillons de la population de départ prélevés au cours du temps.

Ces expériences permettent d'aborder deux sortes de problèmes en biologie, qui peuvent être indépendants, mais qui se superposent le plus souvent :

- soit un composé A qui, dans la cellule, est normalement transformé en B, puis en C, puis en D…, le long d'une chaîne de réactions (on ne se préoccupe pas ici des compartiments où ces réactions ont lieu). Il suffit de fournir le composé A radioactif aux cellules ; s'il pénètre, il sera pris en charge par les processus qui donneront B, puis C, puis D…, et ces composés deviendront successivement radioactifs. Après la période de *pulse*, les cellules à qui on ne fournit plus A radioactif utilisent à nouveau du A non radioactif (endogène ou exogène) pour fabriquer B, C et D. Au cours du temps, on a donc une vague de synthèse de produits radioactifs qu'on peut identifier par les techniques de la biochimie, et qui indiqueront exactement l'ordre des réactions ;
- soit un composé A qui entre dans la cellule et se trouve au départ dans un compartiment X. Peu après, sans transformation, il passe dans un compartiment Y, puis dans Z… Il ne s'agit plus ici de modifications biochimiques mais de simple transport dans la cellule. Si on fait un *pulse* bref

avec A radioactif, le compartiment X restera très peu de temps marqué ; le marquage sera ensuite localisé dans Y, puis dans Z. La technique privilégiée pour suivre ce genre de transport est évidemment l'autoradiographie (voir plus loin).

En réalité, les cellules qui absorbent un composé le métabolisent tout en le faisant passer d'un compartiment à un autre. Cela signifie que les approches biochimiques et cytologiques sont indissociables. Le succès d'une telle expérience, c'est-à-dire la lisibilité du résultat, tient à la brièveté et à la netteté du *pulse* : il faut que les cellules cessent d'incorporer brusquement la substance radioactive. Ceci dépend en particulier de l'activité spécifique du marqueur, qui doit être aussi élevée que possible, et de la sensibilité des techniques de détection. Le début de la chasse est marqué par des lavages abondants des cellules pour éliminer tout reste de radioactivité, adsorbée ou dans le milieu. De plus, afin de diluer le marqueur qui persiste inévitablement dans le cytoplasme de la cellule, on fournit à celle-ci la même molécule, non radioactive, en forte concentration dans le milieu. L'entrée massive de ce composé conduit ainsi à un ralentissement brutal de l'incorporation du marqueur au cours du métabolisme ; cet artifice permet d'assurer des *pulses* efficaces. Ces expériences constituent un outil unique pour l'analyse du métabolisme ainsi que celle de nombreux processus cellulaires.

2.2.4. Détection des molécules marquées

Elle met en œuvre deux types principaux de techniques : le comptage direct des particules grâce à des **compteurs** appropriés et la technique dite d'**autoradiographie**.

Les compteurs sont de deux types.

• **Compteur** de type **Geiger** : les particules émises ionisent un gaz situé dans une enceinte renfermant deux électrodes portées à un haut potentiel ; les électrons primaires sont accélérés et provoquent de nouvelles ionisations en cascade, de sorte qu'un bref courant est enregistré entre les deux électrodes. Celui-ci est transformé en signal sonore ou enregistré par un compteur d'impulsions. Cet appareil n'est plus guère utilisé car il ne décèle que les rayonnements β^- de très forte énergie.

• **Compteur à scintillation** : l'émission sert à exciter une molécule «scintillante» qui réagit en émettant des photons ; on fait alors une mesure de lumière au moyen d'un photomultiplicateur qui amplifie et transforme ce premier signal en courant électrique. Pratiquement, l'échantillon radioactif est mis dans une fiole remplie d'un solvant contenant le produit scintillant ; puisqu'il y a un contact étroit entre l'isotope et le scintillant, même les rayonnements β^- les plus faibles sont détectables.

Cette dernière technique a permis l'extension considérable de l'utilisation du tritium, qui est un isotope peu coûteux et d'usage aisé. Le plus fréquemment, l'échantillon se présente sous forme d'un filtre (ayant retenu un précipité, par exemple), d'un fragment de chromatogramme, ou de tranche de gel d'électrophorèse. Les résultats donnés par les compteurs sont des cpm (coups par minute), qu'il faut corriger pour tenir compte du rendement pour l'émission considérée ; ces valeurs sont proportionnelles au nombre d'atomes radioactifs contenus dans l'échantillon.

L'autoradiographie permet de localiser avec précision une espèce moléculaire radioactive dans un échantillon plan. Cette méthode est basée sur le principe selon lequel les composés radioactifs impressionnent les émulsions photographiques vierges. Les particules β émises par le ^{3}H, le ^{14}C ou le ^{32}P réduisent les grains de bromure d'argent contenus dans l'émulsion en argent métallique, à la manière de la lumière. Dans un premier temps, il y a formation d'une image latente au niveau des cristaux d'AgBr atteints par le rayonnement ; leur réduction est achevée par un révélateur, qui conduit à la formation de grains d'argent visibles. Le fixateur élimine enfin tous les cristaux d'AgBr n'intervenant pas (voir *figure* 3.15).

L'autoradiographie appliquée à des coupes histologiques ou des écrasements de cellules est une technique de biologie cellulaire ; elle est aussi très utilisée en biochimie ou en biologie moléculaire, et s'applique alors à des plaques de chromatographie ou des gels d'électrophorèse. Dans le cas des coupes, l'émulsion est directement coulée sur l'échantillon collé sur la lame de verre ; s'il s'agit de plaques ou de gels, un film rigide (de type radiographie médicale) est étroitement appliqué contre eux. Après un temps d'exposition variable (de quelques minutes à quelques jours), en fonction de la quantité de radioactivité et de la nature de l'isotope utilisé, le film sensible est révélé et traité comme une épreuve photographique. On observe, dans l'émulsion, une accumulation de grains d'argent à l'endroit précis de l'émission des

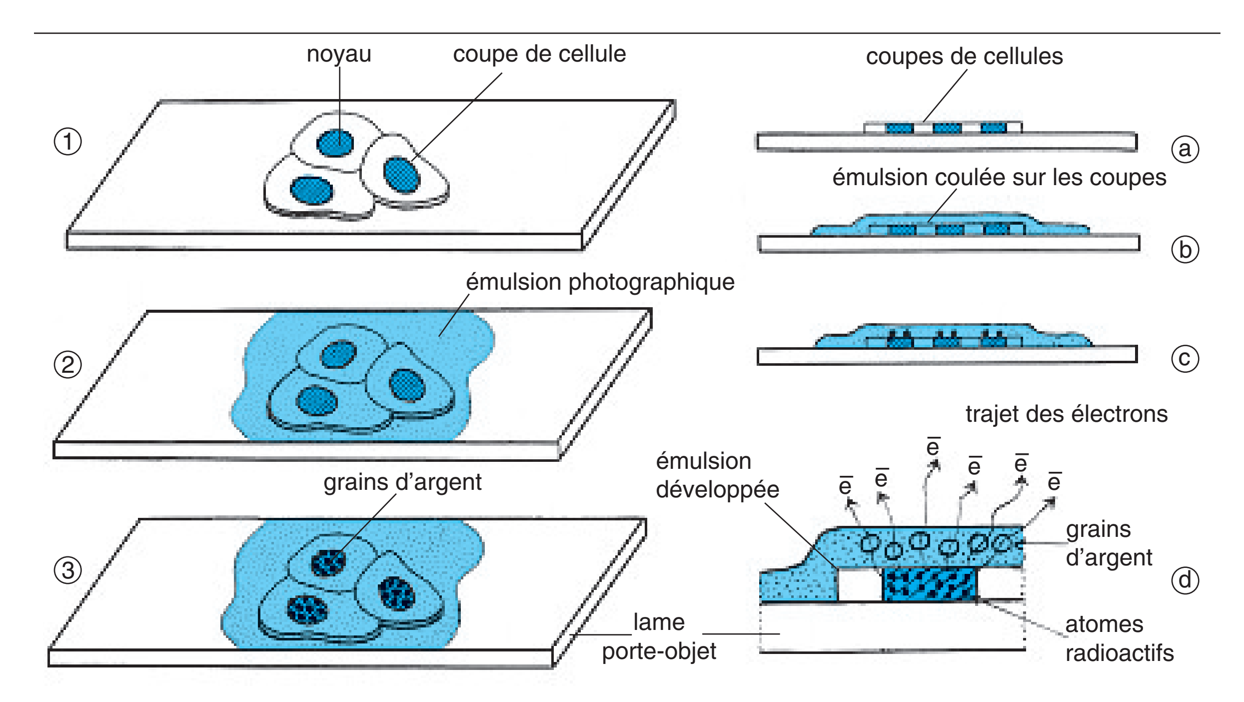


Figure 3.15
Principe de l'autoradiographie
La technique est ici appliquée à des coupes traitées pour la microscopie photonique.
Les cellules analysées ont incorporé, avant le traitement, un précurseur radioactif spécifique de l'ADN (thymidine tritiée), de sorte que seuls les noyaux apparaîtront marqués après développement de l'émulsion.
(1) Coupes de cellules marquées collées sur une lame de verre. **(2)** Coulage d'une émulsion photographique à l'obscurité. **(3)** Aspect des coupes de cellules après développement de l'émulsion.
(a), **(b)** et **(c)** : aspect en coupe des préparations **1**, **2** et **3** ; **(d)** : secteur agrandi de **(c)**.

particules (au-dessus de l'échantillon biologique marqué, s'il s'agit de coupes). En autoradiographie à haute résolution, pour la microscopie électronique, la technique de développement conditionne la forme des grains d'argent développés qui matérialisent la radioactivité (grains punctiformes ou en forme de tortillons ; voir *figure* 3.16).

2.3. Cytoenzymologie

C'est l'ensemble des techniques permettant de localiser *in situ* des réactions enzymatiques spécifiques ; cette approche, comme la cytochimie, a connu son heure de gloire dans les années 60 et est abandonnée de nos jours, au moins sous sa forme initiale. Elle est cependant relayée par des méthodes dérivées basées sur les mêmes principes, qui seront donc brièvement rappelés ; elle sera illustrée par deux exemples (phosphatase et succinodéshydrogénase) traités sous forme d'encarts dans les chapitres 7 et 10.

Dans la mesure où l'on visualise l'existence de fonctions associées aux protéines, il est évident que celles-ci doivent être actives dans le matériel utilisé. Or, la plupart des traitements histologiques habituels (fixation, inclusion…) conduisent à dénaturer et inactiver les protéines. Il faut donc travailler sur du matériel vivant, avec toutes les limitations évoquées à ce sujet dans le chapitre 2, ou bien sur du matériel coupé ayant subi une fixation légère aux aldéhydes (non dénaturante) et une inclusion douce (milieux d'inclusion hydrosolubles), ou enfin sur du matériel traité par congélation, dans lequel les protéines restent intactes (techniques de cryofixation et cryotomie). Dans les deux derniers cas, des protocoles existent pour la microscopie photonique et la microscopie électronique. La méthode des coupes permet évidemment d'obtenir des localisations beaucoup plus précises que lorsqu'on étudie des cellules entières.

La difficulté de la **cytoenzymologie** tient au fait que c'est un mode de détection indirect de macromolécules catalytiques, par le biais des produits des réactions catalysées. Or, la plupart des compo-

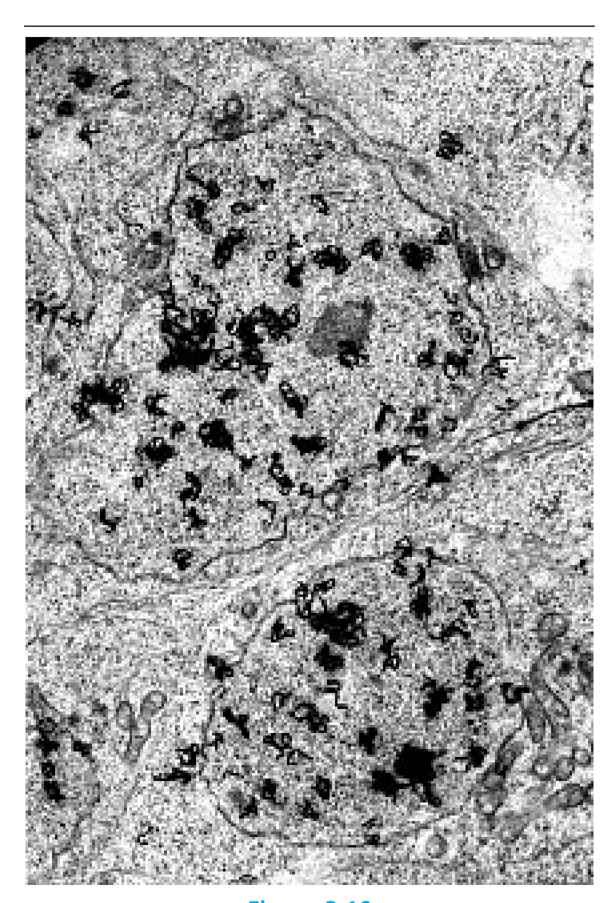


Figure 3.16

Cliché d'autoradiographie en microscopie électronique

Cette coupe montre la synthèse d'ADN dans deux noyaux de spermatocytes de poisson. Les cellules ont été incubées en présence de thymidine tritiée ; les «grains» d'argent sont localisés au niveau de la chromatine. Cliché J.-C. Clérot, Labo. BC4, Orsay.

sés mis en jeu dans les réactions enzymatiques (substrats et produits) sont d'une part incolores et invisibles, et d'autre part hydrosolubles et diffusibles. Dans ces conditions, il semble évident que le lieu d'action d'une enzyme sera bien difficile à repérer avec précision dans une cellule ou une coupe histologique. Les chimistes ont découvert des molécules artificielles, mais pouvant être reconnues comme des substrats spécifiques par les enzymes, et ayant les propriétés suivantes :

– incolores au départ, elles deviennent colorées après avoir été modifiées par l'enzyme, ou bien, ayant une certaine couleur, elles en changent après la réaction ;
– solubles au départ, elles deviennent insolubles après la modification catalysée et précipitent sur place, c'est-à-dire sur le lieu de la réaction.

Si ces conditions sont remplies, le produit de la réaction s'accumule en abondance là où existe l'enzyme, et conduit à un précipité coloré visible en microscopie optique, ou opaque aux électrons et détectable en microscopie électronique. De nombreuses hydrolases et enzymes d'oxydoréduction ont ainsi pu être localisées à l'échelle des structures ou ultrastructures cellulaires.

2.4. Sondes fluorescentes d'activités métaboliques

Divers composés de conception récente sont utilisés à l'heure actuelle pour visualiser des activités enzymatiques ou des processus physiologiques particuliers, *in situ*, au sein des cellules vivantes. Leur simplicité de mise en œuvre et la diversité des mécanismes étudiables sont telles que les techniques de cytoenzymologie traditionnelles ne sont plus guère employées. Tous ces composés ont en commun d'être à l'origine de phénomènes de luminescence ou de fluorescence, qui sont facilement détectables avec des microscopes appropriés (plus complexes que les microscopes classiques, car nécessitant des systèmes de vidéo-amplification !).

On distingue trois types de situations :

– le composé artificiel employé fait l'objet d'une modification chimique profonde qui entraîne l'apparition de la propriété de fluorescence ; on parle de **substrat fluorogénique**, par opposition aux substrats chromogéniques utilisés dans les méthodes classiques ;
– le composé entre dans un organite où il rencontre des conditions physicochimiques (pH) telles qu'il devient fluorescent ;
– le composé fixe une autre molécule ou un ion (caractéristiques d'un compartiment, dans lequel il est entré, ou bien qui sont libérés à l'occasion d'une activité cellulaire particulière) ; le complexe, qui seul est fluorescent, est ensuite détecté.

Quelques exemples classiques peuvent être donnés.

• Le **diacétate de fluorescéine** (composé hydrophobe) pénètre aisément dans les cellules vivantes où il est décomposé en acétate et fluorescéine sous l'action d'estérases variées ; ce dernier composé est détectable grâce à sa fluorescence verte. La fluorescéine libérée dans le hyaloplasme ne peut plus franchir de membrane lipoprotéique, car elle est hydrophile. Cette propriété est utilisée en biologie

végétale comme test de viabilité des grains de pollen, par exemple. La grande vacuole centrale typique des cellules végétales différenciées apparaît en «négatif» sur les images car la fluorescéine ne peut y entrer.

• La **rhodamine 123** ou le composé nommé **DASPMI** pénètrent spécifiquement dans les mitochondries sous l'action du gradient de protons transmembranaire qui caractérise cet organite (au niveau de sa membrane interne). Accumulées dans la matrice mitochondriale, ces substances fluorescent vivement et permettent une visualisation très nette des organites (voir *figure* 3.17).

• L'**æquorine** (protéine tirée d'une espèce de méduse) fixe sélectivement les ions Ca^{2+}, ce qui induit sa luminescence. L'injection de cette protéine dans une cellule permet donc de suivre d'éventuelles modifications de la concentration en ions Ca^{2+} libres dans le hyaloplasme, où ceux-ci se trouvent habituellement très dilués. Bien que délicate à mettre en œuvre, cette technique de marquage a permis l'analyse des processus de pénétration ou de libération massive et transitoire de l'ion Ca^{2+} à partir de compartiments de stockage, lors du processus de fécondation, par exemple.

• De nombreux composés susceptibles de pénétrer spontanément dans les cellules, et capables de lier spécifiquement (en devenant fluorescents) tous les ions rencontrés dans les cellules, ont été mis au point. Ils sont utilisés non seulement pour visualiser leur présence, mais aussi pour mesurer leur concentration instantanée. Les plus connus sont la chlorotétracycline et les composés nommés : QUIN-2, indo-1 et fura-2, tous spécifiques de Ca^{2+} ; la carboxyfluorescéine, qui fixe les H^+, est un indicateur fluorescent du pH intracellulaire ; d'autres composés sont spécifiques des ions Na^+ et K^+… On comprend l'intérêt que présentent ces sondes, quand on sait le rôle crucial des ions dans de nombreux processus de signalisation cellulaire et dans la régulation des activités métaboliques (voir chapitre 13).

2.5. Utilisation de la GFP pour l'étude de la localisation de protéines dans des cellules vivantes

La GFP (green fluorescent protein) est une protéine provenant d'une espèce de méduse nommée *Aequorea victoria*, chez qui elle provoque une bioluminescence naturelle. Elle présente deux pics d'absorption de la lumière (dans l'ultra violet et dans le bleu) et réémet dans le vert ; c'est le seul exemple de protéine connue pour fluorescer intensément sans nécessiter de substrats additionnels. Le gène codant cette petite protéine de 238 acides aminés a été cloné en 1992 et, depuis lors, son utilisation en biologie cellulaire et moléculaire ne cesse de se développer.

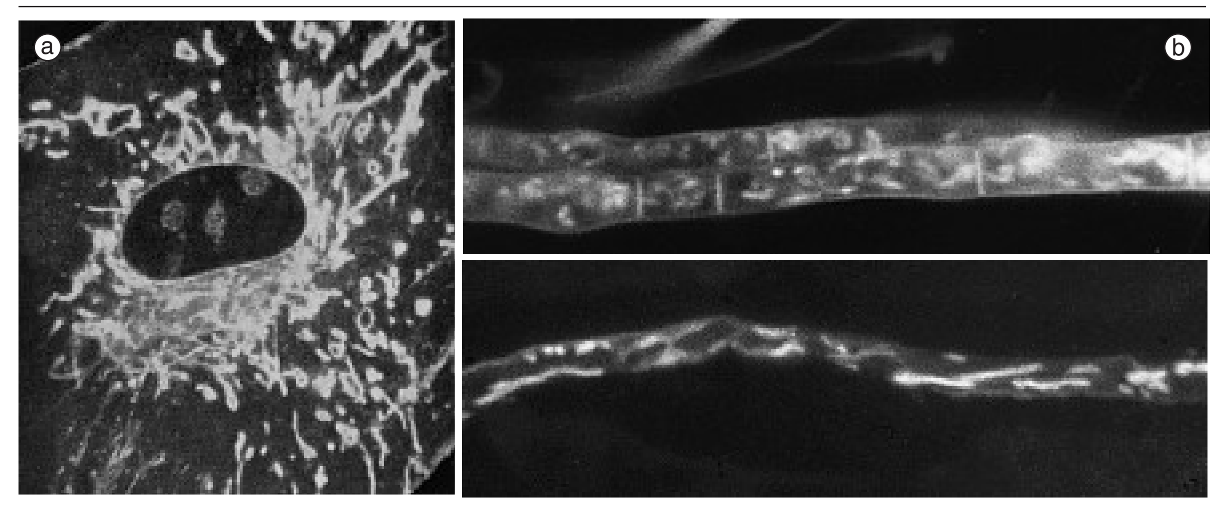


Figure 3.17

Mise en évidence des mitochondries grâce à des sondes fluorescentes d'activités physiologiques

(a) Fibroblaste coloré à la rhodamine 123 ; **(b)** Filaments de Champignon colorés au DASPMI (cliché D. Zickler, Orsay). Noter le polymorphisme important des mitochondries.

La GFP garde sa fluorescence *in vivo* quand elle est fusionnée à une autre protéine, grâce aux techniques du génie génétique. Le gène qui la code peut en effet être mis en phase à la suite d'un gène de protéine d'intérêt X au sein d'une construction (telle un plasmide) obtenue par manipulation de l'ADN *in vitro*. Cette séquence codante, munie des signaux appropriés, est introduite dans une cellule au sein de laquelle elle s'exprime normalement en produisant une protéine-chimère. Il est alors possible d'observer au microscope à fluorescence, dans des cellules vivantes, la localisation de la protéine X-GFP ainsi synthétisée.

Cette technique permet donc de suivre, en temps réel, le trafic intracellulaire d'une protéine et sa dynamique (son adressage), ainsi que de nombreux autres phénomènes biologiques : mouvements d'organites, migrations cellulaires, déplacements de virus. L'utilisation de la GFP tend actuellement à remplacer, chaque fois que cela est possible, des approches parfois anciennes et souvent très lourdes, telles que : marquage radioactif et autoradiographie, cytoenzymologie ou immunocytochimie. Ces méthodes avaient aussi l'inconvénient de nécessiter la fixation des cellules et n'autorisaient pas des analyses *in vivo*.

On comprend donc bien tout l'intérêt de ce nouveau système de marquage (ou étiquetage) moléculaire, qui a ouvert une ère nouvelle en Biologie Cellulaire et trouve également des applications en Biologie Moléculaire, comme molécule « reporter ».

2.6. Analyse génétique des activités cellulaires

Dans les premiers travaux de MENDEL et de ses successeurs, les mutants ont été employés pour découvrir les lois de transmission des caractères héréditaires et établir la théorie fondamentale dite **théorie chromosomique de l'hérédité**. Pendant près d'un demi-siècle, les mutations ont été utilisées comme de simples outils génétiques (marqueurs) permettant de différencier des souches. C'est seulement à partir des années 1940 que l'on a commencé à analyser la manière dont les gènes gouvernent des réactions chimiques dans les cellules.

L'établissement de la relation directe existant entre les gènes et les protéines (BEADLE et TATUM : « un gène-une enzyme ») a conduit à l'élucidation de toutes les chaînes du métabolisme intermédiaire, aussi bien chez les Procaryotes que chez les Eucaryotes (voir chapitre 4). La sélection de mutants dits **auxotrophes**, présentant des exigences trophiques supplémentaires par rapport à la souche sauvage, a été conduite chez divers organismes favorables à une analyse génétique. La combinaison des études génétiques et physiologiques implique la possibilité de travailler sur les deux phases (haploïde et diploïde) du cycle vital des êtres eucaryotiques. Seuls quelques micro-organismes exceptionnels ont été retenus par les expérimentateurs ; ils appartiennent aux groupes des Champignons et des Algues : *Neurospora, Sordaria, Chlamydomonas* et surtout la levure de bière, ce dernier organisme étant actuellement l'Eucaryote le plus connu au plan génétique.

La recherche s'est orientée vers la caractérisation de **mutants conditionnels** thermosensibles, qui expriment leur phénotype particulier dans certaines conditions de température uniquement, et présentent ainsi une souplesse d'utilisation remarquable. La possibilité de réaliser des tests dits de **complémentation fonctionnelle**, en confrontant au sein d'un même cytoplasme l'expression de divers gènes mutés, deux à deux, constitue un avantage considérable : le principe consiste à rassembler dans une cellule diploïde, par fusion cellulaire, les génomes de deux cellules haploïdes mutantes. Si les génomes parentaux sont mutés au niveau du même gène, aucun des deux n'apporte à la cellule diploïde la capacité de réaliser la fonction normalement déterminée par ce gène. Si ces génomes sont mutés respectivement sur deux gènes différents concourant à l'expression de cette fonction, chacun des deux apportera dans la cellule diploïde l'information qui manque à l'autre et cette cellule réalisera la fonction qu'aucun des deux parents haploïdes n'était capable d'assurer. Outre le fait qu'il conduit à définir les caractéristiques de dominance ou de récessivité des mutations isolées, ce test permet de les classer rapidement en groupes fonctionnels correspondant aux différentes étapes des processus affectés.

L'analyse génétique constitue un outil incomparable pour disséquer des phénomènes qui peuvent être d'une grande complexité. On peut citer trois exemples classiques d'utilisation de tels mutants de levure en biologie cellulaire.

• Le **cycle cellulaire** a été analysé dès la fin des années 1970, grâce à une vaste collection de mutants dont le développement était bloqué à des stades différents du cycle. Leur caractérisation a abouti à

formuler un modèle universel chez les Eucaryotes (voir chapitre 13). L'approche moléculaire relativement aisée chez ce micro-organisme a permis de développer des outils (en particulier des sondes d'ADN) qui ont été transférés avec succès à des organismes plus complexes, ce qui a conduit rapidement à élargir le champ de cette problématique.

• L'organisation du **génome mitochondrial**, son expression, sa réplication et surtout la biogenèse complexe de ces organites ont été finement analysées grâce à de nombreuses mutations portées par l'ADNmt. Ces mutations, à transmission non mendélienne et létales chez les autres organismes eucaryotiques, sont en effet analysables chez la levure qui a la possibilité unique de se passer de ses mitochondries pour son métabolisme énergétique (grâce à la fermentation alcoolique).

• Le processus de **sécrétion des protéines**, impliquant le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de GOLGI, est depuis peu de temps analysé au moyen de mutants présentant des anomalies de ces mécanismes (voir chapitre 9).

Dans un domaine qui déborde un peu la biologie cellulaire, il faut enfin signaler l'existence des mutations touchant le développement embryonnaire animal ou végétal, principalement chez la drosophile et chez *Arabidopsis* (une crucifère). Cette dernière catégorie de mutations (dites homéotiques) représente un nouveau moyen très performant pour comprendre les mécanismes régissant le développement précoce des Eucaryotes pluricellulaires. La possibilité de provoquer des mutations dirigées, c'est-à-dire ciblées vers des gènes précis mais dont le rôle est mal connu, pour en déduire leur fonctionnement normal, constitue le dernier outil mis au point dans ce domaine ; cette technique, développée initialement chez la levure, a été transférée avec succès chez la souris.

2.7. Extraits acellulaires assurant des fonctions biologiques complexes

Les premiers systèmes *in vitro* ont été les tests enzymatiques mis au point par les biochimistes ; ils permettaient l'étude de réactions simples dans des conditions bien contrôlées. Cette approche a été complétée par celle du fractionnement cellulaire, qui a conduit à intégrer toutes ces réactions au sein d'organites ou de structures vésiculaires plus ou moins compliqués. L'étape suivante a consisté à mettre au point des systèmes acellulaires autorisant l'étude de processus biochimiques complexes. Ces extraits sont tirés d'organites, qui ont eux-mêmes été fractionnés de manière à conserver des fonctions physiologiques nécessitant de gros édifices supramoléculaires.

Parmi ces activités, on peut mentionner : la synthèse des protéines sur les ribosomes (avec ou sans microsomes), les mécanismes de réplication de l'ADN qui impliquent de très gros complexes enzymatiques, les processus de maturation des ARN chez les Eucaryotes, l'importation post-traductionnelle des protéines dans les organites, divers processus d'autoassemblage. Des fonctions aussi élaborées que le battement ciliaire, la contraction musculaire, la migration de vésicules le long des microtubules, sont actuellement approchées par de tels systèmes. L'intérêt considérable de ces outils est qu'on peut, dans la mesure où ils ont été suffisamment simplifiés, les décomposer ensuite en leurs éléments constitutifs et tester ceux-ci séparément dans des expériences de reconstitution ; plusieurs d'entre eux seront décrits dans cet ouvrage.

2.8. Cytofluorimétrie en flux et triage de cellules

Cette technique optique, appelée aussi **cytométrie en flux continu**, s'applique à des populations de cellules isolées en suspension (organismes unicellulaires, cellules animales en culture, cellules provenant d'un tissu mais dissociées enzymatiquement, protoplastes de cellules végétales…) et permet de les analyser individuellement, de manière automatique, par rapport à toute propriété pouvant impliquer une fluorescence. Le principe consiste à marquer spécifiquement les cellules à sélectionner dans la population grâce à un colorant fluorescent, qui peut être un anticorps dirigé contre une protéine de surface (et auquel un fluorochrome a été greffé), ou bien un composé se fixant à l'ADN du noyau et responsable d'une fluorescence (BET ou DAPI).

L'appareil utilisé comporte un système injectant, sous pression, la culture cellulaire ainsi traitée dans une buse très étroite, conçue de telle sorte que les cellules défilent une à une devant une petite fenêtre traversée par un fin faisceau laser de longueur d'onde appropriée. La lumière réémise par les cellules marquées est analysée et mesurée par des photomultiplicateurs. Dans le cas d'un marquage des noyaux, on peut identifier, dans une

population non synchrone, les cellules en fonction de leur stade dans le cycle cellulaire (G_1, S, G_2) ; le résultat se présente sous la forme d'un histogramme monoparamétrique (en fonction de la teneur en ADN) ou bien d'un diagramme biparamétrique, quand des corrélations entre paramètres sont possibles (voir chapitre 13).

Un dispositif de type vibrateur ultrasonique permet aussi de fractionner la veine liquide en microgouttelettes contenant une seule cellule ; chaque gouttelette identifiée peut alors être affectée d'une charge électrique positive, négative ou nulle, selon la nature ou l'intensité du signal reçu par le détecteur optique. L'intérêt de cette opération est que des gouttelettes différemment chargées peuvent être plus ou moins déviées et séparées les unes des autres dans un puissant champ électrique établi entre deux plaques déflectrices : on réalise ainsi un **triage cellulaire**. Ceci permet de récupérer dans des récipients distincts des populations cellulaires éventuellement viables, possédant des caractéristiques de fluorescence bien précises. Le traitement d'une cellule ne demandant qu'une milliseconde, il est possible d'étudier des populations considérables en peu de temps.

D'autres objets biologiques que des cellules sont séparables par l'appareil, en particulier des chromosomes isolés qui peuvent être classés selon leur contenu en ADN ; ceci constitue un préalable important dans les études sur le génome des cellules eucaryotiques. Le triage cellulaire apparaît donc comme une technique extrêmement puissante au service de la biologie cellulaire.

RÉSUMÉ

L'étude des constituants cellulaires est menée à deux niveaux et selon deux types de méthodes, statiques ou dynamiques : les premières identifient et localisent avec précision les molécules constitutives des structures cellulaires, les secondes étudient leurs modifications chimiques ou leurs déplacements au sein des organites ou des cellules.

Le fractionnement chimique permet de distinguer les grandes familles de molécules minérales ou organiques (précurseurs et macromolécules : protéines, polysaccharides et acides nucléiques). La chromatographie et l'électrophorèse, avec toutes leurs variantes, constituent de puissantes techniques conduisant à l'isolement et à la purification des biomolécules ; de même, des macromolécules ou des édifices supramoléculaires de grande taille (ribosomes, Virus…), sont séparés grâce à l'ultracentrifugation en gradient de saccharose ou de CsCl. Enfin, les diverses macromolécules sont visualisables au niveau des structures grâce aux méthodes de la cytochimie, mais on peut aussi détecter avec précision des espèces individuelles de protéines ou d'acides nucléiques au moyen de sondes immunologiques (immunocytochimie) ou nucléiques (hybridation *in situ*).

Une étude exhaustive nécessite la purification des organites et la mise en œuvre des techniques du fractionnement cellulaire : après homogénéisation des cellules, les différents organites ou édifices supramoléculaires sont séparés les uns des autres par des centrifugations successives. L'observation directe des macromolécules isolées et purifiées est enfin possible lorsque la coloration négative, l'ombrage métallique ou la microscopie à effet tunnel sont utilisés. Le fonctionnement des cellules est abordé sur des systèmes biologiques simplifiés, homogènes et reproductibles, tels que les cultures pures de cellules animales, végétales ou de micro-organismes. L'obtention de lignées mutantes et la possibilité de mettre en œuvre les démarches de la génétique classique et moléculaire conduisent à « décortiquer » un grand nombre de fonctions capitales dans la vie des cellules : cycle cellulaire, synthèse et sécrétion des protéines…

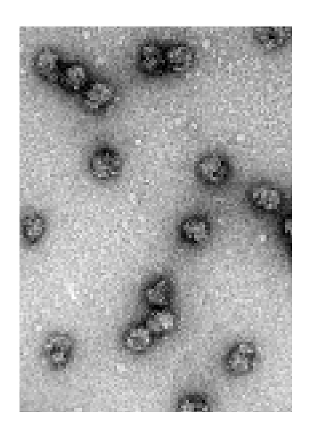
Les précurseurs radioactifs constituent un outil irremplaçable pour l'étude de la physiologie cellulaire, en raison de la sensibilité de détection des molécules marquées, aussi bien dans des extraits biologiques (comptage à scintillation) que dans des structures cellulaires (autoradiographie). Les expériences de *pulse-chase* permettent de suivre le devenir d'une population de macromolécules marquées pendant un temps très bref. Certaines activités physiologiques sont directement visualisables dans les cellules vivantes, grâce aux techniques de la cytoenzymologie et à l'utilisation de sondes fluorescentes d'activités métaboliques ; cette approche est donc complémentaire de la précédente.

La mise au point de systèmes *in vitro* assurant des fonctions biologiques complexes constitue une étape indispensable dans l'analyse des mécanismes moléculaires permettant leur réalisation. Enfin, la sélection et le triage de catégories cellulaires homogènes, au sein d'une population hétérogène, sont possibles grâce à la cytométrie en flux, qui analyse toute caractéristique biologique identifiable et mesurable par fluorescence.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Décrire les objectifs et les méthodes du fractionnement chimique.
2. Quels sont les principaux types de chromatographie ?
3. Quelles différences importantes existent entre l'électrophorèse native et l'électrophorèse dénaturante ?
4. Quel est le principe d'un protocole de centrifugation différentielle ? Quels en sont les avantages et les inconvénients ?
5. Qu'appelle-t-on «centrifugation en gradient» ? combien existe-t-il de types différents de cette méthode ?
6. Décrire les objectifs et les méthodes générales de la cytochimie.
7. Même question pour l'immunocytochimie.
8. Même question pour l'hybridation *in situ*.
9. Décrire les objectifs et les principales étapes d'un protocole de fractionnement cellulaire.
10. Quels sont les différents types de cultures de cellules animales ?
11. Quelle est la différence entre un isotope lourd et un isotope radioactif, et avec quelles méthodes et/ou outils peut-on détecter ces deux types d'isotopes ?
12. Donner quelques exemples d'isotopes radioactifs particulièrement utilisés en Biologie et en Physiologie Cellulaires ?
13. En quoi consiste une expérience de *pulse-chase* et quel est son intérêt ?
14. Expliquer l'intérêt des mutants pour l'étude des phénomènes biologiques et en donner quelques exemples classiques en Biologie Cellulaire.
15. Quels sont les principes et les utilisations de l'autoradiographie ?
16. Décrire les objectifs et les méthodes générales de la cytoenzymologie.
17. En quoi consiste la technique de visualisation in vivo des protéines nommée «marquage à la GFP» ?
18. Qu'appelle-t-on «sonde fluorescente d'activité métabolique» ?
19. Dans quelles conditions réalise-t-on un test de complémentation fonctionnelle, et quelles réponses permet-il d'obtenir ?
20. En quoi consiste la technique nommée «cytométrie en flux continu» ?



Chapitre 4

FLUX DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

Structure et expression des gènes. Organisation des génomes

Les chapitres 1 et 2 nous ont montré que les êtres vivants parviennent à maintenir un haut degré d'organisation dans un univers minéral qui tend irréversiblement vers un désordre croissant, au sens de la thermodynamique. De plus, ils sont aptes à se perpétuer, en se reproduisant à l'identique de génération en génération (au moins en première approximation). Cette continuité est nécessairement régie à l'échelle de la cellule par un centre d'information ou de planification, qui est transmis aux cellules-filles lors des divisions successives. Ce centre, nommé matériel génétique, commande la réalisation de toutes leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et moléculaires.

Les molécules constituant le matériel génétique doivent posséder plusieurs propriétés fondamentales : 1) permettre le stockage d'une information, 2) assurer la réalisation du programme qu'elles renferment, 3) être capables de se reproduire à l'identique, et 4) permettre et tolérer une certaine variabilité, condition indispensable à une évolution, second trait caractéristique du monde vivant, après l'hérédité.

Le matériel génétique est formé d'entités distinctes appelées gènes dont la fonction est, pour leur majorité, de contrôler la synthèse des protéines, qui sont les constituants et les acteurs principaux de toutes les activités cellulaires.

On appelle processus génétiques fondamentaux les activités de réplication et d'expression de l'information génétique d'une part, et de gestion de la variation génétique d'autre part. Ces processus, identiques chez tous les êtres vivants, reposent sur des mécanismes conceptuellement simples, car basés sur l'utilisation de structures linéaires. Toutes les molécules impliquées dans ce système : ADN, ARN et protéines, ont en effet une caractéristique commune : ce sont de longs polymères non ramifiés. Des règles simples de correspondance point par point sont établies entre ces molécules ; elles permettent de comprendre à la fois comment s'effectue le codage de l'information, et sa réalisation finale en termes de protéines.

Après quelques rappels historiques relatifs à l'identification de la nature chimique du matériel génétique et à l'élucidation du mode d'action des gènes, des notions élémentaires de biologie moléculaire, concernant les mécanismes de l'expression de ces derniers, c'est-à-dire le recopiage sous forme d'ARN de l'information contenue en général dans l'ADN (transcription), et la synthèse des protéines (traduction), sont données dans ce chapitre. L'accent est mis sur les mécanismes propres aux Procaryotes, généralement plus simples que ceux décrits chez les Eucaryotes (dont l'étude sera faite dans le chapitre 8). Une présentation succincte de l'organisation générale des génomes viraux, bactériens et eucaryotiques, termine ce développement.

1. IDENTIFICATION DE LA NATURE CHIMIQUE DU MATÉRIEL HÉRÉDITAIRE

Les premières expériences efficaces relatives au matériel héréditaire furent conduites par G. MENDEL, qui postula l'existence d'entités formelles contrôlant des caractères morphologiques, ultérieurement nommées gènes. À la même époque, F. MIESCHER isolait chimiquement l'ADN, sans qu'une relation entre les deux démarches soit faite. Un siècle exactement s'est écoulé entre le travail de ces précurseurs et la découverte des mécanismes moléculaires régissant l'expression des gènes. L'encart historique suivant retrace les principales étapes de cette longue histoire.

1.1. Expériences historiques sur les Bactéries et les Virus

La première d'une série d'expériences décisives a été réalisée en 1928, par F. GRIFFITH, qui démontra que l'on pouvait modifier les caractéristiques héréditaires d'une souche de Bactéries responsable d'une pneumonie chez la souris (*Diplococcus pneumoniae*). Le principe simplifié de cette expérience, dite de **transformation bactérienne**, est illustré dans la *figure* 4.1. L'identification de l'espèce moléculaire impliquée dans ce phénomène, à savoir l'ADN, eut lieu en 1944 (voir l'encart suivant). Pour des raisons techniques, liées à la simplicité des méthodes biochimiques disponibles alors, la démonstration fut essentiellement faite de façon négative (perte de l'activité d'un extrait transformant en partie purifié, après digestion enzymatique

ENCART HISTORIQUE

Découverte de la nature chimique du matériel génétique

1866 : MENDEL publie ses expériences sur la transmission des caractères héréditaires et détermine les lois de leur ségrégation indépendante ; l'ensemble conduira à la notion de gène.

1869 : MIESCHER isole pour la première fois l'ADN, qu'il nomme nucléine, à partir de noyaux des cellules constituant le pus ; il donne sa composition chimique globale et identifie en particulier le phosphore, qui distingue radicalement cette molécule des protéines.

1900-1920 : établissement de la théorie chromosomique de l'hérédité.

1910-1930 : la composition en bases des acides nucléiques et la structure des nucléotides sont établies (LEVENE) ; les acides thymonucléiques (ADN) et zymonucléiques (ARN) sont distingués.

1928 : GRIFFITH réalise sa célèbre expérience sur la transformation *in vivo* de Pneumocoques non virulents grâce à leur co-injection avec des Pneumocoques virulents morts, à des souris.

1930-1933 : la transformation bactérienne s'avère possible *in vitro* (DAWSON et SIA) et même grâce à un extrait acellulaire de Pneumocoques virulents morts (ALLOWAY).

1943 : SCHRODINGER postule que le matériel héréditaire est un message chimique codé.

1944 : le «principe transformant» de GRIFFITH est identifié à l'ADN, grâce à une approche enzymatique, par AVERY, MAC LEOD et MAC CARTY.

1948 : BOIVIN et VENDRELY affirment, sur la base de dosages chimiques précis, que l'ADN contenu dans les noyaux des cellules eucaryotiques est le support des caractères héréditaires.

1952 : la nature chimique du matériel génétique d'un bactériophage (Virus de Bactérie) est identifiée à l'ADN (HERSHEY et CHASE).

1953 : la structure moléculaire en double hélice de l'ADN est établie par WATSON et CRICK. Sur la base de cette découverte, GAMOW explicite la notion de code génétique et pose les problèmes de son décryptage et du fonctionnement des gènes. L'ère de la biologie moderne commence.

1956 : le matériel génétique du Virus de la mosaïque du tabac (VMT) est identifié à l'ARN (FRAENKEL-CONRAT).

1961-1966 : le code génétique universel est complètement déchiffré et les principaux mécanismes de l'expression de l'information génétique sont élucidés chez les Bactéries.

1975 : naissance de l'ingéniérie génétique.

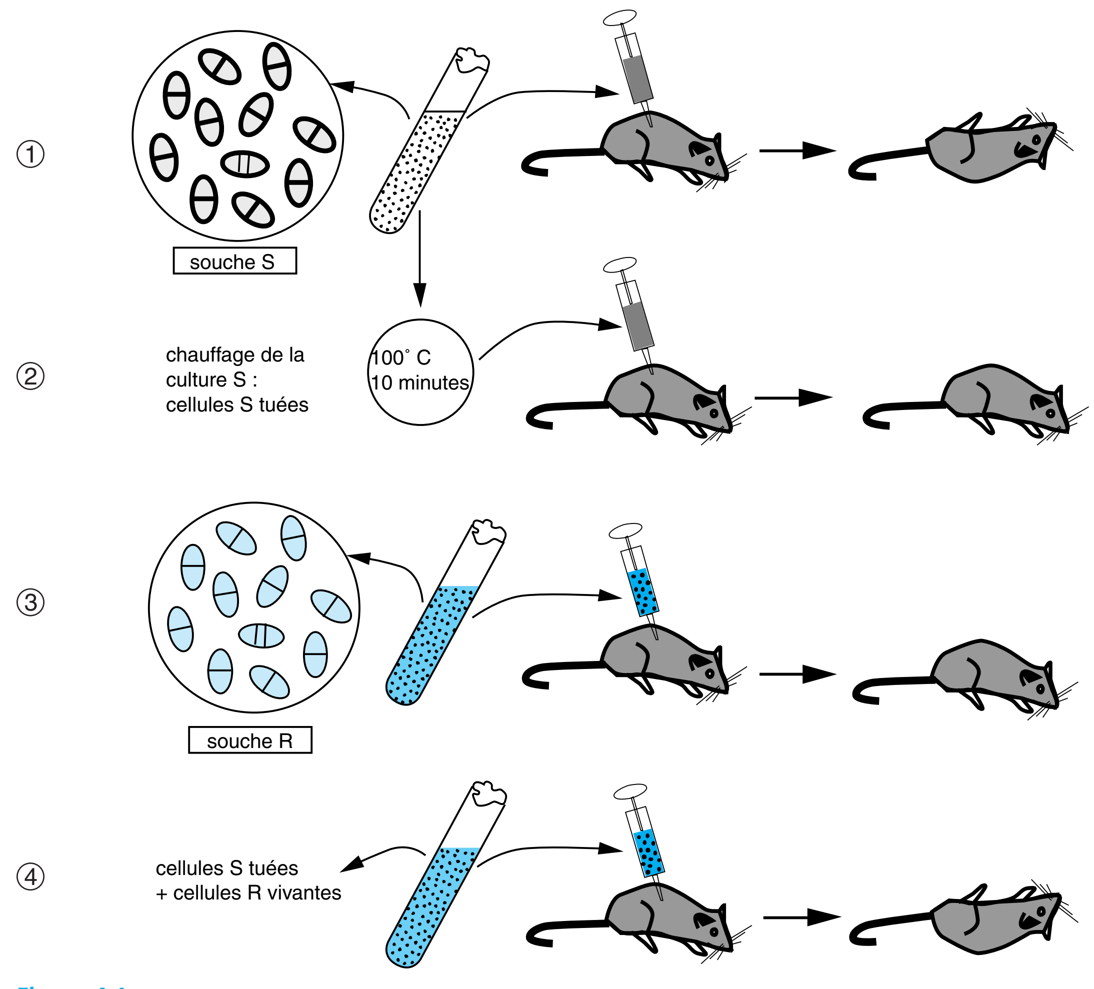


Figure 4.1

Principe de l'expérience de transformation bactérienne réalisée par GRIFFITH

(1) Injection à une souris de Bactéries d'une souche virulente (dite S) : l'animal meurt de pneumonie. **(2)** Injection de Bactéries de la même souche S, tuées par la chaleur : l'animal survit. **(3)** Injection de Bactéries d'une souche mutante non virulente (dite R) : l'animal survit. **(4)** Injection d'un mélange de Bactéries S tuées par la chaleur et de Bactéries R vivantes : l'animal meurt.
On peut récupérer des cellules virulentes S (= «R transformées») du corps de ce dernier. Les cellules R sont dépourvues de capsule et phagocytées par les globules blancs, d'où leur absence de virulence.

par une ADNase) et l'impact de ces expériences ne fut pas celui qui aurait été mérité. Les généticiens de cette époque, familiers des seuls organismes dits supérieurs, n'étaient pas prêts à entendre le discours des microbiologistes ; de plus, l'ADN était alors considéré par les biochimistes comme une molécule ayant une structure monotone, et ne pouvant donc porter aucune information.

Dans la décennie qui suivit, il fut clairement démontré que le matériel génétique des Virus était aussi un acide nucléique : l'ADN, dans le cas d'un bactériophage, et l'ARN dans le cas d'un Virus de cellules végétales (VMT). C'est à la même époque que fut élucidée la structure de la molécule d'ADN, apportant enfin des réponses aux multiples interrogations concernant le fonctionnement du matériel génétique.

1.2. Données sur les génomes eucaryotiques

Jusqu'à une époque relativement récente, il n'y avait pas de preuve du fait que l'ADN constituait le matériel génétique des Eucaryotes. De nombreux arguments convergents, allant dans ce sens, pouvaient cependant être rassemblés :

– la théorie chromosomique de l'hérédité, explicitement formulée dès le début du XXe siècle, affirme que la ségrégation des gènes se calque exactement sur l'histoire des chromosomes ;
– pratiquement tout l'ADN des cellules est localisé dans le noyau et dans les chromosomes ;
– la quantité d'ADN est constante dans les noyaux de toutes les cellules somatiques, même très différenciées, d'un organisme donné, alors que ce n'est pas le cas pour les autres composés ;
– l'ADN est métaboliquement stable au cours de la majeure partie du cycle cellulaire : il ne présente pas de renouvellement, comme le montrent tous les autres constituants cellulaires ;
– les agents physiques ou chimiques responsables des mutations, et affectant le matériel génétique, ont pour cible unique l'ADN.

Depuis 30 ans environ, les méthodes de la biologie moléculaire et du génie génétique démontrent que l'ADN est ici aussi le support de l'information génétique. Il est en effet possible d'isoler des fragments d'ADN eucaryotique contenant des séquences identifiables à des gènes, puis de les transférer à des cellules receveuses, où ils s'expriment de la manière attendue, après intégration éventuelle dans le matériel génétique de l'hôte. Il s'agit des expériences de clonage et d'expression de gènes eucaryotiques chez les Bactéries, de transformation de la levure de bière, de transfection de cellules animales ou végétales, et de construction d'organismes transgéniques (OGM).

1.3. De la conception « mendélienne » des gènes aux hypothèses sur leur mode de fonctionnement

Aussi longtemps que les caractères étudiés par la génétique concernaient des traits tels que le nombre, la disposition, la forme ou la taille des organes, comme le faisaient MENDEL et ses successeurs, sur des organismes supérieurs, le lien entre caractère et gène responsable ne pouvait pas être compris. La complexité du déterminisme du phénotype, sa précocité éventuelle au cours du développement embryonnaire mettaient trop de distance entre l'effet primaire du gène et son résultat visible. Le premier exemple d'une corrélation directe entre un gène et un produit chimique a été fourni par les travaux d'un médecin : A. E. GARROD (voir l'encart suivant).

ENCART BIOMÉDICAL

L'alcaptonurie : première maladie génétique humaine identifiée

En 1901, A. E. GARROD décrit une maladie rare et héréditaire, plutôt bénigne, dont les symptômes sont les suivants : l'urine des patients prend une couleur noire à l'air libre, et les cartilages ainsi que les tendons sont colorés en brun. Les malades accumulent dans l'organisme, le sang puis les urines, un composé nommé « acide homogentisique », auto-oxydable et virant au brun, absent chez les sujets sains. Le déterminisme génétique est simple : un seul gène est responsable de l'anomalie (les malades étant homozygotes et porteurs d'un allèle récessif). Lorsque les acides aminés phénylalanine ou tyrosine sont absorbés en abondance par les malades, leur taux d'acide homogentisique augmente beaucoup dans le sang et les urines, tandis qu'il n'y a pas de conséquence chez les individus normaux. Chez ceux-ci, la forme allélique dominante du gène permet la dégradation de ce dernier composé en CO_2 et H_2O.

GARRROD énonce en 1908 une hypothèse novatrice selon laquelle une altération du métabolisme peut être liée à la mutation d'un seul gène ; c'est la célèbre notion « d'erreur innée du métabolisme ». Pour la pemière fois, une correspondance entre un gène et un composé chimique précis est formulée ; il faudra attendre près de 40 ans pour comprendre le sens de cette observation. L'unique enzyme modifiée et déficiente, chez les malades, a été identifiée en 1951.

Plusieurs observations de même nature ont été réalisées chez les Végétaux durant les années 20 ; en effet, les pétales de nombreuses fleurs sont colorés par des pigments de couleurs variées, en particulier des anthocyanes. Il a été prouvé, par l'utilisation de variants naturels, que des changements de nature des pigments étaient liés à la modification de gènes uniques. De même, une approche associant la génétique formelle à des expériences très sophistiquées de greffes d'organes montrait, chez la drosophile, en 1935, que la couleur des yeux était liée à la présence d'un pigment résultant de l'action de plusieurs gènes agissant « en cascade », et responsables de l'apparition de divers composés intermédiaires hypothétiques.

Cependant, en raison du nombre limité des analyses établissant un lien de causalité directe entre

un gène et un produit chimique, souvent non identifié, aucune théorie générale sur le mode de fonctionnement des gènes ne pouvait être énoncée. C'est l'utilisation d'un modèle biologique plus simple, bien connu sur les plans génétique et physiologique, combinée à l'utilisation systématique de mutations induites expérimentalement, et surtout un changement de la stratégie de l'approche, qui ont permis des avancées significatives dans la résolution de ce problème.

Contrairement à leurs prédécesseurs, BEADLE et TATUM décident, au début des années 40, d'identifier les gènes en jeu dans le contrôle de réactions biochimiques déjà connues ; les biochimistes ont en effet établi la notion de **chaîne de biosynthèse** et identifié de nombreuses enzymes catalysant ces réactions. Ces auteurs s'appuient, en particulier, sur des travaux concernant le cycle de l'urée, qui fonctionne chez certains Vertébrés (KREBS et HENSELEIT, 1932). Dans un premier temps, ils définissent les besoins nutritifs minimaux d'une souche d'un Champignon nommé *Neurospora*, très facile à étudier en laboratoire. Cette **souche** naturelle, dite **sauvage**, pousse de façon continue sur un milieu minéral simple contenant une source de carbone (un sucre) et quelques vitamines (**milieu minimum**). À partir des éléments de ce milieu, elle est capable de fabriquer tous les composés essentiels à sa vie, parmi lesquels les acides aminés constitutifs de ses protéines (souche **prototrophe**).

En soumettant cette souche à des agents mutagènes, ces auteurs obtiennent de nombreux mutants indépendants, dont ils ne retiennent que ceux qui sont incapables de croître sur le milieu minimum, mais capables de pousser sur un milieu contenant une grande diversité de molécules organiques (**milieu riche**). Chez ces mutants, qui ont visiblement perdu la capacité de synthétiser un composant vital, la déficience génétique est compensée par l'apport d'un (ou plusieurs) métabolite(s) fourni(s) par le milieu (souches **auxotrophes**). Parmi ceux-ci, les auteurs sélectionnent les mutants exigeant uniquement l'acide aminé arginine ; ces souches, notées Arg^-, sont aptes à croître sur le milieu minimum auquel on a ajouté ce seul acide aminé (**milieu supplémenté**).

Après une analyse génétique, seules sont conservées les souches présentant une mutation récessive n'affectant qu'un seul gène. Celles-ci sont ensuite testées pour leur croissance sur des milieux supplémentés en divers composés chimiquement proches de l'arginine, tels que l'ornithine ou la citrulline ; selon les biochimistes, ces deux composés sont censés participer à la synthèse de l'arginine chez les Animaux. Ce **test trophique** permet d'identifier trois catégories de mutants Arg^-, selon leur croissance ou non sur ces divers milieux, c'est-à-dire en fonction de leur capacité à utiliser ces produits pour les transformer en arginine, seul métabolite utilisable dans la synthèse des protéines. Enfin, sur la base du principe que, si un composé intermédiaire nourrit une souche, c'est que la mutation concerne une étape située en amont, ces trois groupes peuvent être classés de sorte que les trois composés : ornithine, citrulline et arginine, s'ordonnent en une chaîne linéaire (voir *figure* 4.2).

Le **test de complémentation fonctionnelle** (voir chapitre 3) montre que, dans chacun des 3 groupes de mutants, plusieurs souches différentes ont une fonction distincte altérée, ce qui suggère que chaque étape de la synthèse de l'arginine est contrôlée par un seul gène. Les biochimistes prouvent rapidement qu'une souche de *Neurospora* portant un gène muté Arg^- donné se distingue de la souche sauvage par l'absence de l'activité enzymatique permettant la transformation d'un produit spécifique en un autre produit, situé plus en aval dans la chaîne. La conclusion fondamentale de ces études est la suivante : la présence d'un gène muté entraîne l'absence d'une activité enzymatique spécifique, qui est fonctionnelle dans la souche sauvage, le gène sauvage gouvernant donc la synthèse d'une protéine active.

BEADLE et TATUM ont généralisé cette idée en formulant la théorie : **un gène – une enzyme**. Celle-ci constitua une révolution en génétique et fut très fructueuse car non seulement elle proposait un mode d'action précis des gènes, mais surtout elle fournissait un outil pour l'analyse de tout le métabolisme intermédiaire. En quelques années (de 1945 à 1965 environ, époque de la **génétique** dite **physiologique**), la connaissance de ce dernier devait rapidement progresser, dans des organismes très divers. Cette hypothèse, qui constitue un exemple de la règle de correspondance évoquée plus haut, rend parfaitement compte des faits observés dans le cas de l'alcaptonurie ; en effet, lorsqu'une chaîne métabolique est interrompue au niveau d'une étape, le composé situé en amont du blocage n'est plus transformé et s'accumule fortement, au point de devenir facilement détectable (et excrété, dans ce cas précis), alors que ce n'est pas le cas dans la situation normale.

①

Type de souche	Milieu minimum = MM	MM+ ornithine	MM+ citrulline	MM+ arginine
sauvage	+	+	+	+
I	–	–	–	+
II	–	–	+	+
III	–	+	+	+



②

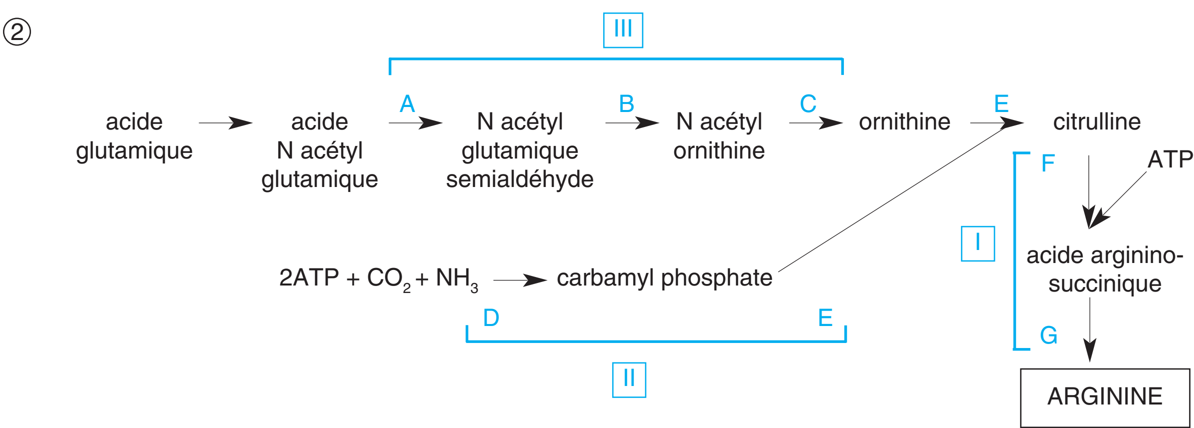


Figure 4.2

Principe des expériences réalisées par Beadle et Tatum sur *Neurospora*

(1) Phénotype nutritionnel de la souche sauvage et des 3 types de souches mutantes Arg^- isolées par Beadle et Tatum. Les 4 milieux de culture permettent d'ordonner les souches mutantes les unes par rapport aux autres. Elles recouvrent 7 catégories différentes de souches (A à G) définies par le test d'allélisme. **(2)** Chaîne de biosynthèse de l'arginine chez *Neurospora* ; elle comprend 3 tronçons dans lesquels chaque étape est catalysée par une enzyme spécifique, dont la synthèse est gouvernée par un gène. Les étapes F et G se déroulent dans le cytosol ; toutes les autres se déroulent au sein de la matrice mitochondriale. Noter l'intervention de l'ATP dans certaines réactions.

2. PRINCIPES DE L'EXPRESSION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE. LE DOGME FONDAMENTAL

L'énoncé de l'hypothèse « un gène – une enzyme » ne préjugeait pas de la façon dont on peut passer de l'un à l'autre ; il faut rappeler qu'à cette époque, non seulement on ignorait la structure de l'ADN et celle des protéines, mais on n'était pas encore vraiment convaincu que l'ADN était le support des caractères héréditaires. L'étape fondamentale suivante a consisté à démontrer que l'on pouvait établir une correspondance étroite entre deux types de molécules, qui se trouvaient être linéaires.

2.1. Colinéarité du gène et de son produit

En même temps que les enzymologistes débrouillaient l'écheveau du métabolisme avec ce nouvel outil, les généticiens analysaient la **structure fine du gène** et mettaient en évidence le phénomène de recombinaison intragénique. Cette approche était possible grâce à l'utilisation de nouveaux organismes permettant l'analyse de très grands nombres de descendants issus d'un même croisement, en particulier les Champignons inférieurs (*Ascobolus*, *Saccharomyces*, *Sordaria*…), mais aussi les Bactéries ou les Virus (bactériophages). La recombinaison intragénique témoigne du fait qu'un gène, au sens fonctionnel, peut être découpé en sous-unités mutables et recombinables (échan-

geables entre chromosomes homologues), indépendantes les unes des autres. Un gène a une structure linéaire que l'on peut représenter par une carte précise de sites mutationnels, dont l'ordre et la distance sont fixés.

En parallèle, les progrès de la biochimie conduisent en 1953 à la démonstration que les protéines sont des molécules linéaires non ramifiées, dont le nombre et la séquence des acides aminés constitutifs sont également définis (séquençage de l'insuline, par SANGER). Cette découverte révolutionne les idées que l'on avait jusque-là sur la structure de ces macromolécules, mais surtout elle permet d'établir une corrélation entre deux structures linéaires fonctionnellement liées. Le concept de **colinéarité gène-protéine** traduit la correspondance point par point, existant entre des sites mutés au niveau d'un gène, et des acides aminés modifiés le long de la chaîne polypeptidique altérée dont il gouverne la synthèse. Il a suffi d'un nombre limité d'exemples concordants pour que cette idée s'impose ; le plus célèbre est celui de la tryptophane synthétase de *Escherichia coli* (*E. coli*) (voir *figure* 4.3). La colinéarité étant établie, restait la question de savoir comment les gènes gouvernent la synthèse des protéines ; il s'agissait non seulement d'identifier les molécules et/ou la machinerie mises en œuvre, mais aussi de décrypter le système de codage assurant la correspondance entre les séquences de nucléotides et d'acides aminés.

2.2. Nécessité d'une molécule intermédiaire entre le gène et la protéine

La notion de colinéarité débouchant directement sur celle de matrice, il était logique de penser que l'ADN pouvait servir directement à ordonner les acides aminés au cours de leur polymérisation. Or il est très vite apparu que le mécanisme devait être plus compliqué que le simple recopiage d'une matrice d'acide nucléique, car il n'existe aucune affinité chimique entre les groupements latéraux des acides aminés et les bases des nucléotides. Il n'est pas possible d'aligner l'ensemble d'une structure peptidique de protéine sur une structure nucléotidique de gène. Par ailleurs, plusieurs observations prouvent que l'ADN n'est pas indispensable en soi à la synthèse des protéines : depuis les années 50, il existe des systèmes acellulaires de traduction dans lesquels la polymérisation *in vitro* des polypeptides se fait en l'absence d'ADN, et on sait, chez les Eucaryotes, que la synthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme, alors que presque tout l'ADN est localisé dans le noyau.

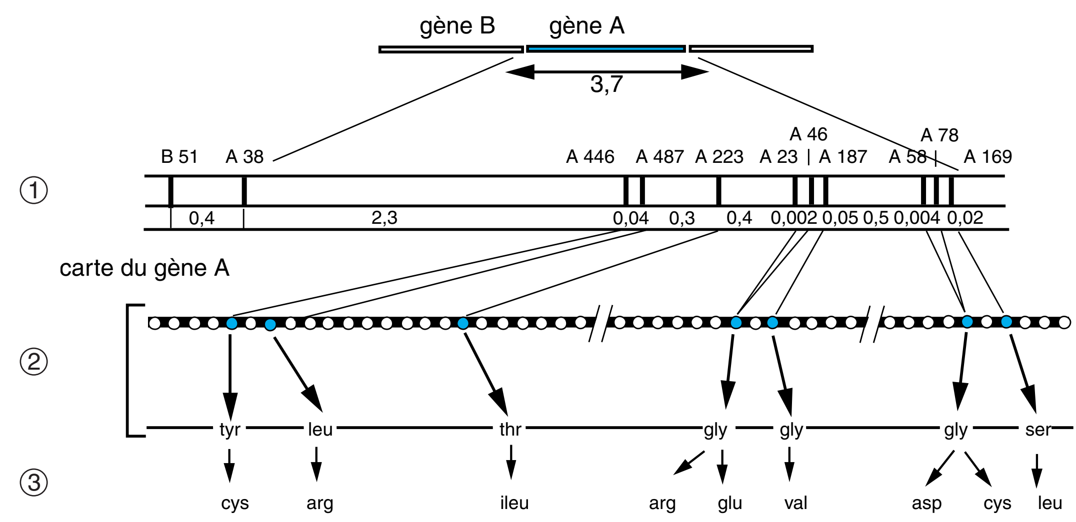


Figure 4.3

Principe de la colinéarité dans le gène A de la tryptophane synthétase de *Escherichia coli*

(1) Carte génétique fine du gène A ; chaque souche mutante est identifiée par une lettre et un nombre, et les distances entre les mutations sont indiquées (% de recombinaison). **(2)** Représentation des acides aminés de la chaîne polypeptidique sauvage, correspondant à la région C terminale du gène A. **(3)** Nature des acides aminés substitués rencontrés dans les souches mutantes.

Puisque l'ADN ne faisait pas office de matrice, on a supposé qu'une espèce moléculaire intermédiaire devait exister, à laquelle l'information génétique pouvait être transférée. De très nombreuses observations, essentiellement réalisées chez les Eucaryotes, et développées dans le chapitre 8, ont suggéré que le meilleur candidat pour cette **molécule messagère** (au sens large) était l'ARN ; les principaux arguments sont les suivants :

– les analyses cytochimiques de CASPERSSON et BRACHET (1940) montrent que la quantité de protéines synthétisées, chez les Eucaryotes, est proportionnelle à la teneur en ARN cytoplasmique ;
– l'ARN est fabriqué dans le noyau, au contact de l'ADN, puis il gagne le cytoplasme, où il « déclenche » des fonctions spécifiques, dont la plupart sont liées à l'existence de protéines enzymatiques ou structurales (voir *figure* 8.9) ;
– l'ARN peut, par sa structure, représenter une copie de l'information contenue dans l'ADN.

Les rapports entre ADN, ARN et protéines, sont résumés dans le **dogme fondamental** de la biologie moléculaire, qui indique le sens du flux de l'information génétique :

ADN → ARN → PROTÉINES

On appelle **transcription** le mécanisme qui assure la fabrication d'ARN à partir de l'ADN ; il s'agit d'un processus de recopiage de l'information génétique découlant de la nature même de l'organisation des acides nucléiques, basée sur la complémentarité des paires de bases AT (ou AU) et GC dans des structures double-brin. Ce processus contribue aussi à segmenter le message héréditaire, pour produire des molécules informatives utilisables pour la synthèse des protéines.

La **traduction** permet, quant à elle, la synthèse des protéines ; elle est basée sur un principe très différent et sur l'existence d'une machinerie complexe, qui sera décrite plus loin. En effet, l'ARN, pas plus que l'ADN, ne peut être directement utilisé pour ordonner les acides aminés. Jusqu'à la fin des années 50, on a cru que tous les ARN avaient une fonction de matrice (au sens de message) pour la synthèse des protéines ; la découverte des ARN messagers (ARNm), molécules ayant un rôle bien spécifique dans le processus de traduction, devait bouleverser les conceptions courantes (voir l'encart suivant).

On connaît cependant une exception au dogme fondamental, représentée par le phénomène remarquable de la **transcription inverse** ; celle-ci assure le passage d'une molécule d'ARN à un segment d'ADN double-brin. Cette opération est décrite en particulier lors du cycle des Rétrovirus (voir chapitre 14).

ENCART HISTORIQUE

Découverte des ARNm procaryotiques

En 1958, VOLKIN et ASTRACHAN, travaillant sur le cycle du bactériophage T2, montrent que le matériel génétique de ce Virus entraîne, très rapidement après l'infection de la cellule-hôte, le blocage des synthèses des ARN et des protéines endogènes. Toute la machinerie cellulaire de transcription et de traduction est détournée pour fabriquer les seuls constituants viraux. Ayant marqué les Bactéries infectées avec du ^{32}P au moment exact du cycle où le Virus paralyse le génome bactérien, les auteurs mettent en évidence la synthèse fugace d'un ARN très instable. Celui-ci est remarquable, en ce sens que sa composition globale en nucléotides est identique à celle de l'ADN phagique. Ce résultat étonnant laissa les auteurs perplexes et ne fut pas correctement interprété ; l'idée d'un ARN « messager » n'était pas encore dans l'air !

En 1960, d'autres auteurs reprennent des expériences basées sur le même principe, mais en les appliquant à des Bactéries normales, non infectées. Des marquages très courts avec de l'uridine ^{32}P conduisent à la production d'ARN radioactifs qui ne peuvent être identifiés, après diverses analyses, ni à des ARNr, ni à des ARNt. Leur grande taille, l'hétérogénéité de leurs masses moléculaires, leur faible abondance, en font une nouvelle catégorie d'ARN. À nouveau sur le système du bactériophage T2, il fut montré que la molécule instable décrite plus haut s'associait de façon réversible aux ribosomes préexistants de la cellule, sur lesquels se fabriquent les protéines virales. Il était alors clair qu'une molécule d'ARN, spécifique d'un génome donné, fonctionnant comme messager entre l'ADN et les protéines, intervenait dans la synthèse des protéines, aussi bien dans les conditions normales qu'après une infection virale.

2.3. Machinerie de synthèse des protéines

Il a été démontré, dès le début des années 50, que la synthèse *in vitro* des protéines pouvait être

obtenue dans un système acellulaire simple, dérivé d'un homogénat de cellules de foie ; celui-ci contient seulement un extrait de protéines et d'ARN solubles, des **ribosomes** purifiés, de l'ATP et des ions Mg^{2+}. Dans ce système biochimique reconstitué, des acides aminés radioactifs sont incorporés dans des protéines. Ce type d'observation fut rapidement généralisé à d'autres types cellulaires eucaryotiques, ainsi qu'aux Procaryotes. Le composant majeur du système étant constitué par les ribosomes, on a d'abord cru qu'ils étaient différents les uns des autres et qu'ils portaient eux-mêmes l'information génétique correspondant aux protéines dont ils assuraient la synthèse. Il fut cependant vite démontré que ces particules étaient toutes identiques dans les cellules, contenant en particulier les mêmes ARN (ARNr), et qu'elles ne pouvaient donc pas constituer le message spécifiant les protéines. Cette constatation posait donc la question de l'origine et de la nature de l'espèce moléculaire responsable de cette spécificité ; la découverte des ARNm chez les Procaryotes, à la fin de la décennie, apportait la réponse.

Des expériences de marquage court (*pulse* ; voir chapitre 3), par des précurseurs radioactifs de protéines, de cellules telles que des réticulocytes (qui fabriquent abondamment une seule protéine : la globine), ont conduit à identifier le lieu exact de la polymérisation des acides aminés au sein du hyaloplasme. Grâce à la technique de centrifugation en gradient de saccharose, il est démontré que les protéines naissantes sont associées à des ribosomes assemblés en chapelets (**polysomes**), et réunis par une longue molécule d'ARN (A. Rich, 1963). La microscopie électronique permet de visualiser ces structures qui participent à la synthèse protéique ; l'intervention de l'ARNm est ainsi confirmée de manière directe chez les Eucaryotes.

2.4. Déchiffrage du code génétique

La question du passage d'un alphabet de quatre lettres (celui des acides nucléiques) à un alphabet de vingt lettres (dans les protéines) est celle du **code génétique**, c'est-à-dire du système de correspondance formelle existant entre les deux catégories de séquences. Des considérations mathématiques simples conduisent à l'idée qu'il faut au minimum faire intervenir des groupes de trois nucléotides successifs (triplets), pour spécifier les acides aminés. Des expériences de génétique chez les bactériophages suggèrent aussi que trois nucléotides sont suffisants pour assurer le codage ; on appelle **codons** ces unités élémentaires d'information génétique.

Les expériences de déchiffrage de ce dernier débutent en 1961 ; elles utilisent les systèmes de traduction *in vitro* et des ARNm artificiels, qu'une technologie enzymatique permet de synthétiser. Le premier codon identifié est celui spécifiant la phénylalanine, qui est polymérisée en polypeptide, si l'on utilise une matrice d'ARN constituée uniquement de U (poly U). Le principe des matrices artificielles monotones (poly A, poly C…), puis des copolymères aléatoires (poly A, C, par exemple), qui peuvent contenir huit triplets différents, conduit à l'identification d'un nombre croissant de codons. Une nouvelle approche, qui ne peut être décrite ici, basée sur l'utilisation de simples trinucléotides, et ne nécessitant pas la synthèse complète d'un polypeptide, a permis en très peu de temps de tracer le tableau complet des 64 codons du code génétique universel (voir *tableau* 4.1).

1e position extrémité 5'	2e position U	C	A	G	3e position extrémité 3'
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Tableau 4.1

Code génétique universel

Noter que plusieurs codons spécifient un même acide aminé (dégénérescence du code). Il existe un seul codon Met (AUG), mais on a mis en évidence deux types d'ARNt^{met}, intervenant dans le démarrage et dans l'élongation de la chaîne polypeptidique. Trois codons stop sont identifiés : UAA, UAG et UGA.

3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ET PRODUITS DE LA TRANSCRIPTION DES GÈNES

3.1. Principe de la transcription

La synthèse de l'ARN nécessite trois acteurs :

– un modèle d'ADN qui sert de matrice sur l'un de ses brins ;
– les quatre monomères précurseurs de l'ARN : les quatre ribonucléotides sous forme triphosphate (ATP, UTP, CTP et GTP) ;
– une enzyme : l'ARN polymérase (dite ADN dépendante) qui catalyse l'ensemble des réactions aboutissant à la copie fidèle du brin matrice.

Comme c'est le cas dans la synthèse de toutes les chaînes polynucléotidiques, la croissance de la chaîne néoformée d'ARN s'effectue à son extrémité 3′ OH. La fonction alcool du ribose, qui se présente au nouveau nucléotide triphosphate allongeant la chaîne, permet la soudure, avec élimination simultanée de pyrophosphate. Tous les nucléotides triphosphates sont des molécules riches en énergie (c'est-à-dire que leur hydrolyse est thermodynamiquement très favorisée), au même titre que l'ATP, et c'est l'hydrolyse d'une liaison phosphoanhydride qui permet l'accrochage des nucléotides entre eux le long de la chaîne. De même que pour les deux brins d'une molécule d'ADN, le brin d'ADN transcrit et l'ARN complémentaire sont antiparallèles, et susceptibles de former une double hélice. Lors du processus transcriptionnel, la molécule d'ADN doit s'ouvrir, se dénaturer localement et de façon transitoire, afin que la polymérase puisse recopier un des brins ; le principe de la transcription est donné dans la *figure* 4.4.

En principe, n'importe quel brin d'ADN, sur les deux constituant la molécule, peut être transcrit selon ce mécanisme, mais nous verrons qu'en général, l'un des deux seulement, le long d'un segment donné, est utilisé pour fabriquer l'ARN. Cependant, le long d'une molécule d'ADN, les régions transcrites ne concernent pas toujours le même brin ; cela signifie que, sur un certain segment d'ADN, la polymérase progresse dans un sens donné sur un brin, tandis qu'un peu plus loin

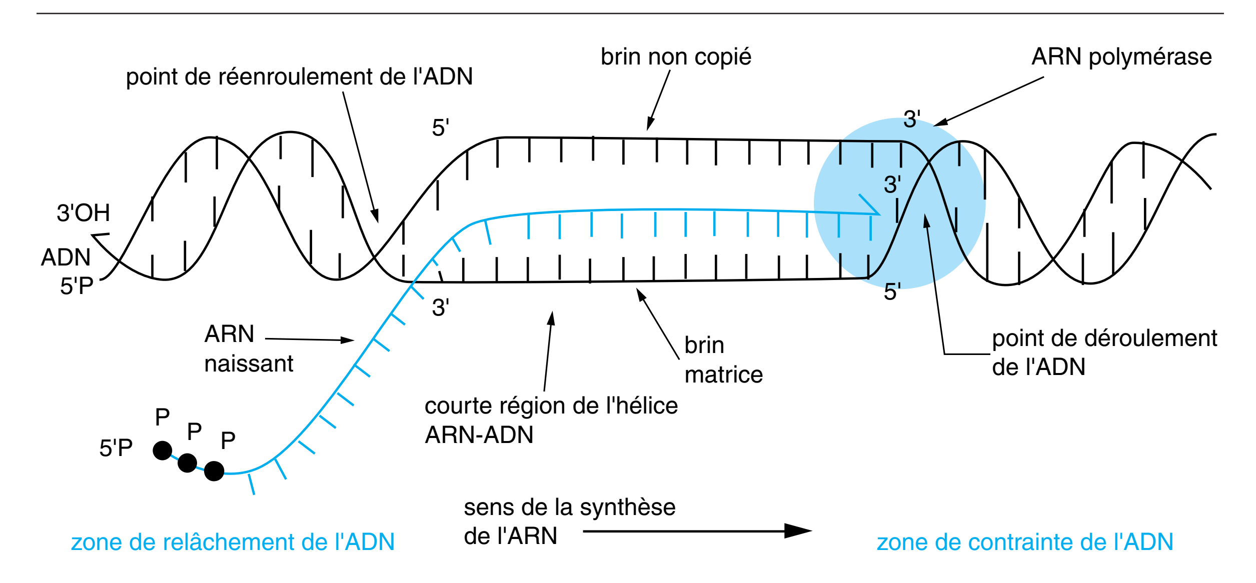


Figure 4.4
Mécanisme général de la transcription
L'œil de dénaturation de l'ADN, au niveau duquel la molécule d'ARN complémentaire du brin matrice est fabriquée, progresse régulièrement le long de la molécule d'ADN (structure à trois brins : triplex). L'ARN polymérase, située dans cet œil au niveau du point d'accrochage entre l'ADN et l'ARN, est donc localisée du côté 3′ OH de la molécule en cours de synthèse, alors que le groupement 5′ Ph se trouve à l'autre extrémité, qui est libre. La chaîne d'ADN non copiée, de même séquence que l'ARN, est parfois nommée brin codant ou brin-sens.

elle peut progresser en sens inverse, sur l'autre brin ; ceci est illustré sur la *figure* 4.5.

Au sein des génomes, les molécules d'ADN sont généralement de très grande taille et contiennent un nombre élevé de gènes. Le cas limite est celui des génomes bactériens qui n'ont qu'une seule molécule d'ADN pour tout support de leur information génétique ; les génomes d'organites et la plupart des génomes viraux rentrent aussi dans cette catégorie. Le message héréditaire, qui est caractérisé par une structure linéaire continue, doit être fragmenté en sous-unités d'information, et ceci se réalise au cours de la transcription.

Chaque gène constitue théoriquement une **unité de transcription**, qui doit avoir un début et une fin (bien que cela soit plus compliqué ! ; voir plus loin). Il existe en fait, le long de l'ADN, des signaux reconnus par l'ARN polymérase, marquant le commencement et la fin du processus transcriptionnel ; c'est également à leur niveau que cette enzyme choisit le brin qu'elle doit transcrire, ce qui décide de la direction dans laquelle elle part. Ces signaux sont constitués par des séquences de nucléotides particulières, généralement communes à tous les gènes et à tous les organismes, bien que différentes chez les Procaryotes et les Eucaryotes. Ces séquences très homologues (dites séquences consensus) sont nommées **promoteurs** et **terminateurs** ; nous décrirons plus loin celles propres aux Bactéries.

3.2. Produits de la transcription : les différentes classes d'ARN

La transcription conduit à la production de molécules d'ARN appartenant à trois grandes familles, présentes chez tous les êtres vivants. Chacune de ces catégories d'ARN a un rôle bien précis dans la synthèse des protéines ; une quatrième catégorie, spécifique des Eucaryotes, sera décrite dans le chapitre 8.

3.2.1. Les ARN ribosomiques, ou ARNr

Ils interviennent dans la réalisation de la structure de grosses particules ribonucléoprotéiques, communes à tous les êtres vivants, appelées **ribosomes**. Il s'agit d'assemblages complexes de protéines et de molécules d'ARN, organisés en deux sous-unités de taille différente ; la plus grosse des deux contient deux ou trois molécules d'ARNr, tandis que la plus petite n'en contient qu'une (leur organisation sera détaillée plus loin).

Chez les Procaryotes, il existe trois catégories d'ARNr, qui ont les tailles suivantes : 2 900, 1 540 et 120 nucléotides ; ils sont quelquefois désignés par leurs coefficients de sédimentation, établis par la technique de centrifugation analytique (voir chapitre 3), et valant respectivement : 23 S, 16 S et 5 S. Chez les Eucaryotes, on trouve quatre catégories d'ARNr, codés dans le génome nucléaire, dont

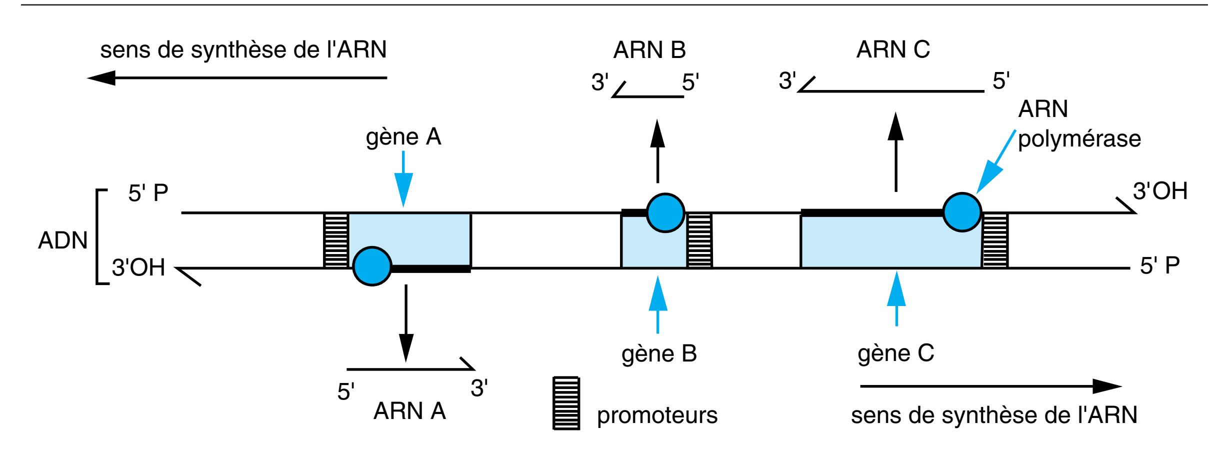


Figure 4.5

Schéma d'un segment de chromosome comportant plusieurs gènes successifs

Ce schéma montre que ce n'est pas toujours le même brin d'ADN qui est transcrit selon les gènes. Les promoteurs, situés en amont des gènes et reconnus par l'ARN polymérase, sont indiqués en hachuré, tandis que les brins-matrice de chaque gène, sur lesquels les ARN sont recopiés, sont figurés en traits épais.

les tailles sont de 4 700, 1 900, 160 et 120 nucléotides (28 S, 18 S, 5,8 S et 5 S). Nous verrons plus loin que leurs organites semi-autonomes (mitochondries et plastes) possèdent des ribosomes spécifiques, et donc des ARNr propres.

Dans les génomes bactériens, les trois catégories d'ARNr sont codées par des gènes présents en plusieurs copies (sept chez *E. coli*) ; ces gènes sont regroupés en ensembles contenant chacun un exemplaire de chaque espèce moléculaire (et associant aussi des ARN de transfert, dont nous parlerons plus loin). Ces ensembles constituent des unités de transcription, dans la mesure où un seul ARN géant est fabriqué, à partir duquel les différents ARN individuels seront obtenus par découpages successifs. La stœchiométrie des ARN dans les particules ribosomiques (1, 1, 1) est donc imposée dès le départ par l'organisation même de leurs gènes et leur mode de transcription.

Les gènes codant les ARNr chez les Eucaryotes seront étudiés dans le chapitre 8 ; nous verrons qu'ils ont aussi une structure complexe, et qu'il existe un nombre élevé de copies par génome. L'existence très générale de copies multiples pour ces gènes, contrairement à ce qui sera observé pour les ARN messagers (en raison de l'**amplification de l'information** qui se déroule lors de la traduction ; voir plus loin), est à rapprocher du fait que les ARNr sont des molécules de structure entrant dans la constitution des ribosomes, qui existent en abondance dans toutes les cellules. Les ARNr représentent près de 80 % de la masse des ARN totaux ; ils sont caractérisés par une grande stabilité métabolique et une durée de vie importante à l'échelle de la vie des cellules. Ceci tient au fait qu'ils appartiennent à des structures contenant des protéines, ce qui conduit à les stabiliser considérablement.

Les ARNr présentent deux particularités remarquables.

• Ils contiennent de nombreuses séquences autocomplémentaires, de sorte que se réalisent de multiples appariements internes (segments en double hélice) et des structures secondaires locales telles que des «épingles à cheveux», ou des systèmes dits «tige-boucle». Tous ces segments en double-brin et simple-brin compactent la molécule et l'organisent dans l'espace selon un schéma bien précis. La représentation de la structure secondaire plane de l'ARNr 16 S bactérien est donnée dans la *figure* 4.6.

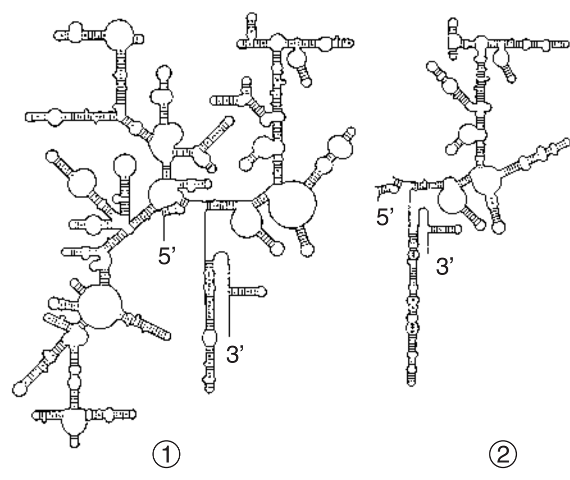


Figure 4.6

Organisation comparée de la structure secondaire de l'ARNr 16 S de *Escherichia coli* **(1)** et de celle d'une partie de l'ARNr 18 S de la levure de bière **(2)**

Noter la ressemblance globale des diverses structures «tige-boucle» rencontrées le long des deux molécules. De nombreuses protéines reconnaissent en fait des domaines de ces molécules pour pouvoir s'y associer par des liaisons faibles et constituer les particules ribosomiques.

• L'organisation générale de cette structure est remarquablement conservée, non seulement chez les Procaryotes, mais aussi chez les ARNr d'origine nucléaire des Eucaryotes, ainsi que ceux rencontrés dans leurs organites semi-autonomes.

Cette conservation de la structure est réalisée malgré une certaine divergence au niveau des séquences primaires ; ceci traduit à la fois une origine évolutive commune très ancienne, et l'existence de contraintes structurales fortes, inhérentes à l'organisation et au fonctionnement du ribosome lui-même. L'intérêt d'une telle situation, comme chaque fois qu'il existe des molécules présentant de fortes homologies de séquence, chez des organismes divers, est que l'on peut établir des parentés entre molécules et retracer des processus évolutifs. Les ARNr, présents chez tous les êtres vivants, sont devenus depuis quelques années des outils privilégiés d'analyse des Évolutionnistes (voir chapitre 16).

3.2.2. Les ARN de transfert, ou ARNt

Ce sont les ARN les plus abondants après les ARNr (10 à 15 % des ARN cellulaires). Ils sont tous de très petite taille, leur longueur n'excédant jamais 80-90 nucléotides (soit une masse moléculaire de

26 à 29 kDa et un coefficient de sédimentation de 4 S environ), d'où leur ancienne dénomination : **ARN solubles.** En raison de leur faible masse moléculaire, le nombre absolu de ces molécules par cellule est considérable. Du fait de leurs propriétés physiologiques et structurales très voisines, il a été longtemps très difficile de purifier des espèces distinctes d'ARNt en quantités importantes. La séquence nucléotidique complète et l'organisation en structure secondaire du premier ARNt caractérisé furent établies en 1964 ; cette molécule, qui liait spécifiquement l'alanine, fut donc nommée ARNt^{ala}. On a montré qu'il existe plusieurs dizaines d'espèces différentes d'ARNt (environ 40) chez les Eucaryotes ou les Procaryotes. Les principales caractéristiques structurales communes à tous les ARNt connus (il y en a plusieurs centaines à ce jour) peuvent être tirées de l'analyse des molécules illustrées dans la *figure* 4.7.

Ces ARN sont dits «de transfert» car ils ont un rôle capital dans la synthèse des protéines : ils permettent la lecture précise de l'information génétique contenue dans les ARN messagers, et participent à la synthèse ordonnée des chaînes polypeptidiques à partir des acides aminés libres du cytoplasme. Leur principale propriété est, en effet, de pouvoir être liés spécifiquement à un acide aminé précis, choisi parmi les 20 trouvés dans les protéines. Nous examinerons plus loin en détail le rôle d'adaptateur de ces ARNt, lors de l'étude de la synthèse des protéines. Les ARNt sont fabriqués à partir de précurseurs, plus longs d'environ 40 nucléotides, qui sont l'objet de coupures et de raccourcissements successifs catalysés par différentes enzymes ; ils ont aussi pour particularité de posséder dans leur séquence de très nombreux nucléotides originaux : dihydro-uridine (DHU), pseudo-uridine (ψ), méthylguanosine (GMe), etc., résultant de la modification chimique des quatre nucléotides classiques après la transcription. Tous ces processus sont rassemblés sous le terme général de **maturation**, que nous préciserons dans le chapitre 8.

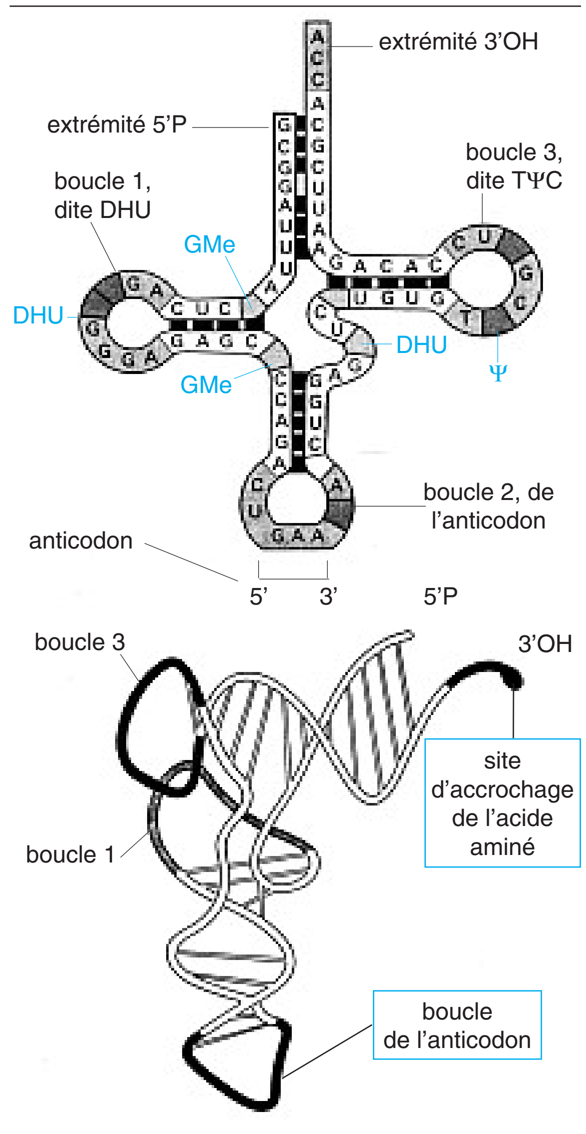


Figure 4.7

Structures secondaire et tertiaire d'une molécule d'ARNt

La structure secondaire plane, dite en «feuille de trèfle», est formée d'une succession de tiges double-brin stabilisées par des paires GC, et de boucles dont la longueur n'excède pas 10 bases (quelques bases modifiées ont été localisées). Cette forme plane s'organise dans l'espace pour donner une structure tertiaire compacte, telle que les boucles 1 et 3 se replient l'une sur l'autre et que la molécule prend l'aspect d'un L majuscule massif. Les deux parties fonctionnellement importantes de celle-ci : l'anticodon et le site d'accrochage de l'acide aminé en 3' OH, sont situées aux deux extrémités opposées.

3.2.3. Les ARN messagers, ou ARNm

Ils sont les copies, totales ou partielles, des gènes codant les chaînes polypeptidiques ; l'information qu'ils représentent se lit d'un bout à l'autre de la séquence codante, traduite en protéine (**phase ouverte de lecture**), codon après codon, entre des signaux spécifiques de démarrage et de terminaison (voir *figure* 4.8). Cette famille d'ARNm est forcément très hétérogène, puisqu'il y a autant de gènes et d'ARNm correspondants, qu'il y a de protéines différentes ; leurs coefficents de sédimentation sont donc très variés. Dans une cellule bactérienne,

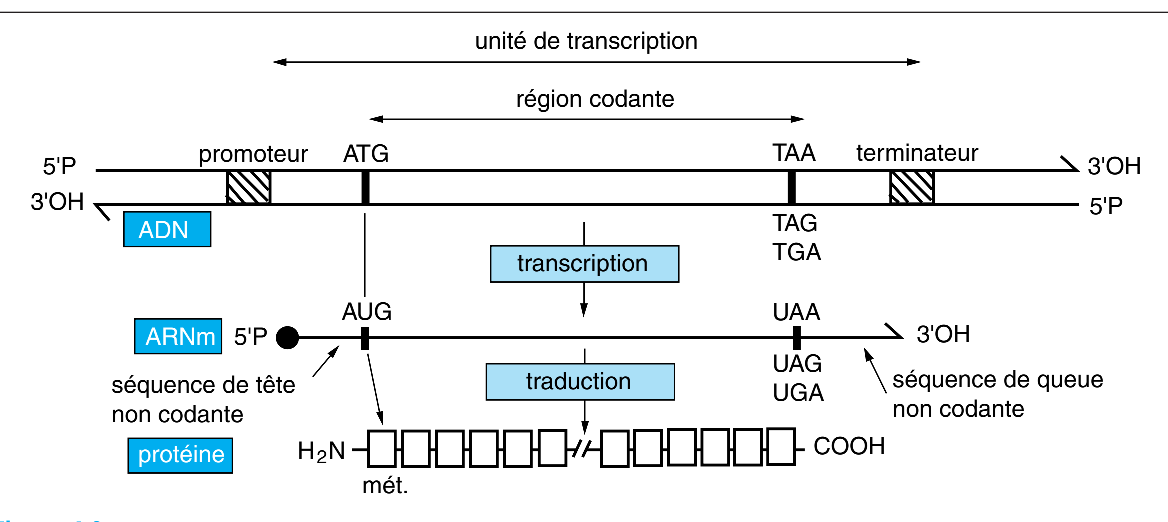


Figure 4.8

Organisation et fonctionnement d'un gène de protéine typique

Les signaux de démarrage (promoteur) et de terminaison (terminateur) de la transcription sont portés sur la molécule d'ADN, et ceux de la traduction sont portés sur l'ARNm. Chaque acide aminé de la protéine est codé par un triplet de nucléotides. Le codon ATG code la méthionine (mét.), les codons TAA, TAG,TGA sont des codons stop. La colinéarité de ces trois molécules apparaît clairement sur ce schéma.

on compte plusieurs milliers d'ARNm distincts, et nettement plus dans une cellule eucaryotique (voir chapitre 8). Contrairement aux gènes des ARNr, ceux codant les ARNm sont en général uniques dans le génome, c'est-à-dire qu'il n'en existe qu'une copie, ou un nombre très limité de copies voisines. À tout instant, un très grand nombre d'entre eux sont transcrits afin d'assurer l'ensemble des fonctions vitales des cellules, à travers les protéines qu'ils codent. Le processus de traduction, qui utilise les ARNm comme source d'information pour spécifier les séquences protéiques, sera exposé plus loin.

Contrairement aux deux classes précédentes d'ARN, il existe des différences majeures entre les ARNm des Procaryotes et ceux des Eucaryotes, tant en ce qui concerne leur synthèse que leur organisation et leur fonctionnement. Les ARNm procaryotiques sont directement utilisables après leur synthèse (voire avant la fin de celle-ci), pour la fabrication des protéines, car ils sont des copies directes des gènes et ne subissent aucune modification chimique par la suite. En revanche, les ARNm des Eucaryotes ont une histoire très complexe, liée à l'organisation discontinue des séquences codantes dans les gènes ; de nombreuses et profondes modifications chimiques, terminales ou internes, des transcrits de ces gènes, interviennent après la transcription proprement dite. Le détail de ces phénomènes, dits de **maturation**, sera donné dans le chapitre 8.

Pour ce qui concerne l'organisation des deux types d'ARNm, les différences sont les suivantes : les ARNm procaryotiques sont de grande taille et codent en général plusieurs protéines (jusqu'à une dizaine) ; on dit qu'ils sont **polygéniques** (on les qualifie parfois de **polycistroniques**), un cistron étant un gène, au sens fonctionnel défini plus haut. Leur fonctionnement et leur mode de contrôle seront décrits un peu plus loin. En revanche, les ARNm des Eucaryotes sont généralement plus courts et codent presque toujours une seule protéine ; ils sont donc dits **monogéniques** (ou **monocistroniques**).

Une caractéristique commune à tous les ARNm est leur durée de vie, qui est toujours très inférieure à celle des deux autres catégories d'ARN. Chez les Procaryotes, cette durée de vie est très courte (de quelques secondes à quelques minutes), tandis que chez les Eucaryotes, on observe des durées de vie variables selon les ARNm, mais en moyenne nettement plus longues que chez les Bactéries (voir chapitre 8). Malgré leur grande diversité et leur nombre élevé, ces molécules ne représentent donc, chez tous les êtres vivants, qu'une toute petite partie de la masse de l'ARN

total (environ 5 %). C'est en particulier à cause de cette faible abondance que la découverte des ARNm a été tardive (début des années 60), et que leur rôle exact d'intermédiaire entre l'ADN et les protéines a été très difficile à mettre en évidence.

Malgré une durée de vie courte, chaque molécule d'ARNm peut servir à la fabrication d'un grand nombre d'exemplaires de la même chaîne polypeptidique. Comme, par ailleurs, chaque gène permet la synthèse d'un grand nombre de copies du même ARNm, on a un système très efficace d'amplification de l'information génétique, tel qu'une seule copie de chaque gène par génome suffit largement à la production de milliers de molécules identiques d'une espèce protéique donnée. Il faut ajouter que la durée de vie des protéines est, de plus, relativement longue par rapport à la vie de la cellule (et de toute façon bien plus longue que celle des ARNm).

4. ORGANISATION DES GÈNES DE PROTÉINES CHEZ LES PROCARYOTES ET LES EUCARYOTES

4.1. Gènes procaryotiques

La disposition et l'organisation des gènes de protéines chez les Bactéries sont caractérisées par deux traits qui les opposent de manière fondamentale à ceux des Eucaryotes : 1) la plupart d'entre eux sont organisés en unités structurales et fonctionnelles très compactes appelées **opérons** ; 2) ils ne possèdent pratiquement que des séquences «utiles» pour la synthèse des protéines, c'est-à-dire qu'ils sont à peu près uniquement constitués des parties codantes, situées entre les codons de démarrage et de terminaison de la traduction. La *figure* 4.9 illustre la différence d'organisation des gènes de protéines chez les Procaryotes et les Eucaryotes.

Un opéron est une succession de gènes, codant chacun une chaîne polypeptidique, séparés les uns des autres par une très faible distance entre le codon de terminaison de l'un et le codon de démarrage du suivant (1-2 nucléotides, jusqu'à 20-30, au maximum). La principale caractéristique d'un opéron est qu'il est transcrit en un seul ARNm polygénique allant d'un bout à l'autre de la structure. Il existe un seul **promoteur** (voir plus loin), situé au début de l'opéron, en amont du point de départ de la transcription, du côté 5′ de l'unique ARNm transcrit. À l'autre extrémité de l'opéron, on trouve évidemment un seul signal de terminaison de la transcription.

Dans le détail, un ARNm polygénique bactérien est donc constitué ainsi :

– du côté 5′ phosphate (5′ P), une courte séquence non codante est comprise entre le premier nucléotide transcrit et le codon AUG de début de traduction du premier gène. Cette **séquence de tête** (ou *leader*) contient une séquence consensus de six nucléotides (dite de SHINE-DALGARNO : AGGAGG), qui intervient comme un signal dans la fixation de la petite sous-unité du ribosome, lors de l'étape de démarrage de la traduction. Cette séquence est responsable du fait que la petite sous-unité ne se fixe pas n'importe où, le long de l'ARNm, et en particulier ne commence pas la traduction au niveau d'un codon AUG quelconque, inclus dans la séquence codante (car dans une protéine il y a d'autres méthionines que celle du début !) ;

– du côté opposé, en 3′ OH, on trouve une courte **séquence** non codante, dite **de queue** (ou *trailer*), située après le dernier codon stop du dernier gène ;

– entre les deux se situent les phases codantes des différents gènes, constituées de triplets ayant un sens, commençant toutes par AUG, et toutes terminées par un UAA, UAG ou UGA. Les courts segments non traduits et situés entre les gènes sont nommés segments intergéniques (voir *figure* 4.10) ; ils peuvent porter, s'ils sont assez longs, une séquence de fixation des ribosomes. Il y a donc très peu de séquences non codantes dans un tel ARN messager.

De façon très générale, les séquences de tête et de queue non traduites des ARNm (procaryotiques ou eucaryotiques) portent des signaux de contrôle de la traduction, permettant de moduler leur durée de vie et leur niveau d'utilisation.

Une autre caractéristique, commune à tous les opérons, est de rassembler des gènes intervenant dans un même domaine métabolique. On peut citer, par exemple, l'**opéron tryptophane** ou bien

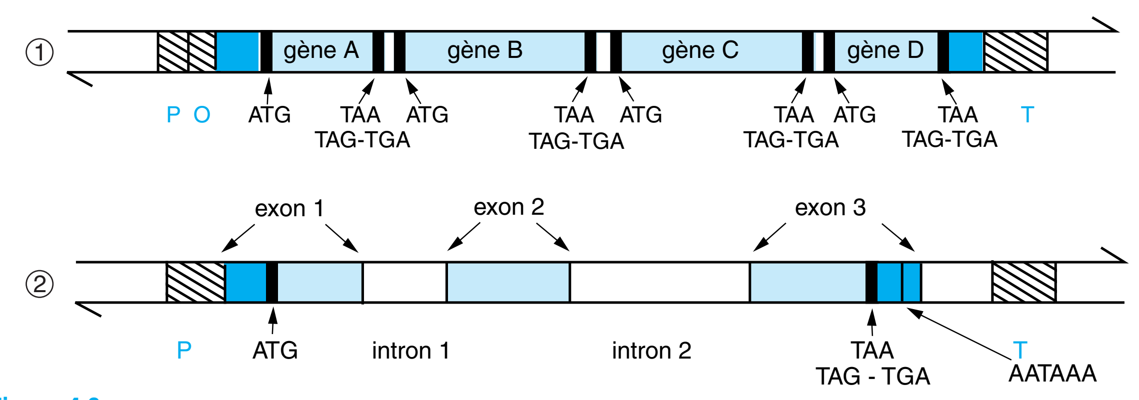


Figure 4.9

Comparaison de l'organisation des gènes de protéines chez les Procaryotes et les Eucaryotes

(1) Les premiers ont une organisation polygénique et une structure continue, que l'on retrouve intégralement dans l'ARNm polygénique qui en est issu ; ce dernier code ici 4 protéines différentes. **(2)** Les seconds ont une organisation monogénique, mais discontinue (structure en mosaïque, avec des introns et des exons), de sorte que l'ARNm final qui est produit, dérivant des seuls exons et codant une protéine unique, ne comporte qu'une partie (parfois mineure) de la séquence de l'ADN.
Le signal AATAAA, propre aux Eucaryotes, sera étudié dans le chapitre 8.
PO : promoteur/opérateur ; P : promoteur ; T : terminateur.

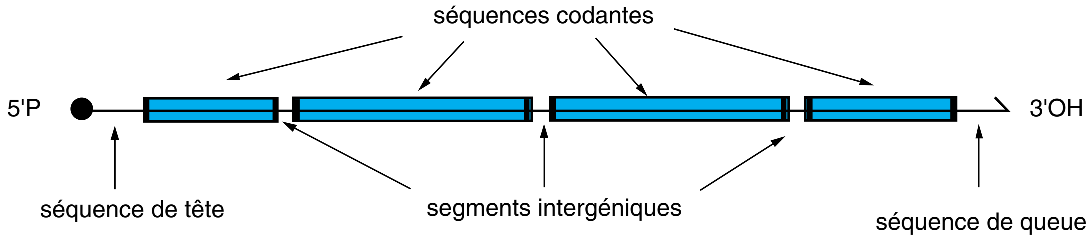


Figure 4.10

Organisation générale d'un ARNm bactérien polygénique
Comparer ce schéma à celui de la figure 4.9 **(1)**.

l'**opéron histidine**, qui regroupent la plupart des gènes (sinon tous !) codant les enzymes correspondant aux chaînes de biosynthèse de ces acides aminés, et comportent respectivement cinq et neuf gènes successifs. L'intérêt de ce regroupement est évident si on raisonne en termes de contrôle coordonné de l'ensemble des gènes associés à une même fonction. Avec une seule séquence promotrice (et une seule protéine régulatrice), la Bactérie contrôle d'un seul coup la synthèse de plusieurs protéines, à travers la fabrication d'un seul ARNm. Ce moyen de contrôle est très économique et dans la ligne de tout ce qui sera dit plus tard au sujet de la stratégie évolutive des Bactéries.

L'opéron le plus classique, car le premier analysé, est l'**opéron lactose**, qui comporte trois gènes codant des protéines intervenant dans l'utilisation de ce sucre par *E. coli* ; son fonctionnement sera décrit plus loin.

4.2. Gènes eucaryotiques

Leur caractéristique majeure est qu'ils sont constitués d'une succession de séquences codantes et non codantes d'ADN, encadrée par des séquences de démarrage de la transcription (et de régulation) en 5′ du transcrit et de séquences de terminaison en 3′. Ces gènes ont donc une structure discontinue, contrairement à celle de la quasi-totalité des gènes de Procaryotes, chez qui la phase codante est continue aussi bien au niveau de l'ADN que de l'ARN ; on parle de **gènes morcelés**,

ou **en mosaïque**. Les séquences codantes d'ADN, dont le message génétique seul sera exprimé en termes de protéines, sont ici appelées les **exons**, tandis que les séquences non codantes, intercalées entre les précédentes et souvent très longues, sont nommées les **introns**.

Le segment d'ADN correspondant à l'ensemble de ces séquences est transcrit en une seule molécule, entre les signaux de démarrage et de terminaison : c'est le **transcrit primaire**, appelé ici **ARN pré-messager**. Cette molécule peut être beaucoup plus longue que l'ARNm cytoplasmique (jusqu'à 100 fois, dans certains cas !), et il est évident que ce transcrit primaire devra être considérablement raccourci, remanié, avant de donner un ARNm mature et fonctionnel (voir *figure* 4.9 et chapitre 8).

5. EXPRESSION DES GÈNES CHEZ LES PROCARYOTES

5.1. Enzymes et signaux de transcription procaryotiques

Les Bactéries ne possèdent qu'une seule ARN polymérase pour transcrire les trois familles de gènes rencontrés dans leurs génomes. Cette enzyme est un gros complexe dont la masse moléculaire est de 450 kDa, constitué de cinq polypeptides. Grâce à une de ses sous sous-unités, le **facteur sigma** (σ), l'enzyme est capable de reconnaître le long de l'ADN des séquences situées en amont des segments à transcrire, appelées **séquences promotrices** (ou **promoteurs**), pour lesquelles elle a une forte affinité. Le rôle des promoteurs est double : ils permettent de positionner précisément la polymérase par rapport à la première base de la séquence d'ADN à transcrire et ils déterminent le choix du brin à recopier.

Le promoteur universel des Procaryotes (commun à tous leurs gènes) est constitué par une séquence d'ADN couvrant environ 40 paires de nucléotides en amont du premier nucléotide transcrit, noté +1. Après l'analyse de plusieurs centaines de gènes de *E. coli* (et d'autres espèces), on a mis en évidence deux blocs de six paires de bases, évolutivement très conservés, situés entre les nucléotides -7 et -12 (TATAAT), et entre – 30 et – 35 (TTGACA). La première séquence citée est parfois appelée ***Pribnow box***, du nom de son découvreur ; très riche en paires de bases A-T, elle constitue une zone facilement dénaturable (voir *figure* 4.11). C'est sans doute cette propriété qui est le signal reconnu par l'enzyme, celle-ci devant commencer par ouvrir la molécule d'ADN avant de la transcrire. Lorsque des mutations affectent l'une ou l'autre de ces deux séquences (et modifient le consensus), l'efficacité du promoteur est considérablement diminuée, alors qu'elle n'est pas perturbée par des mutations se produisant ailleurs. Le facteur sigma agit comme un facteur de démarrage de la transcription et il doit être

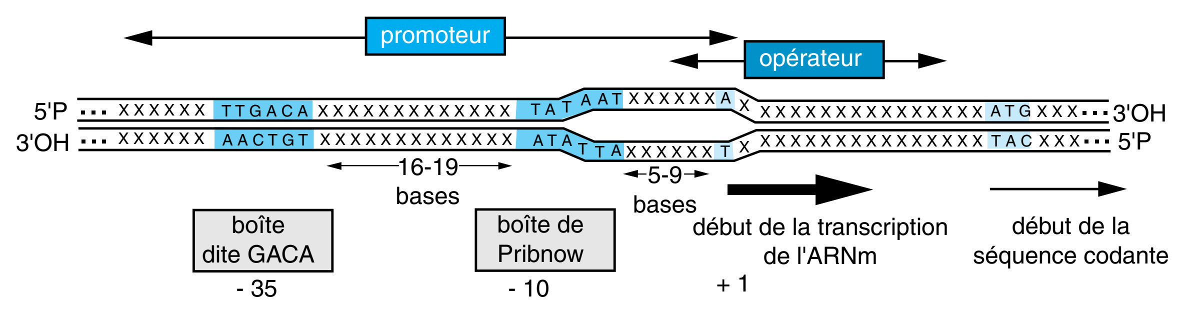


Figure 4.11

Schéma de la région promotrice d'un opéron bactérien

La boîte de Pribnow est située en amont (– 10) du premier nucléotide transcrit (+ 1), qui est très souvent un A. Le promoteur et l'opérateur se chevauchent partiellement (cas de l'opéron lactose), ou parfois totalement.
Dans le cas présenté ici, une partie de l'opérateur est transcrite et incluse dans la région *leader* de l'ARNm.

perdu par l'enzyme, puis remplacé par des facteurs d'élongation, pour que celle-ci puisse continuer à recopier l'ADN.

La synthèse du brin d'ARN se poursuit jusqu'à ce que l'enzyme rencontre sur l'ADN un **signal de terminaison**. Cette structure particulière est constituée de deux domaines riches en GC, situés à proximité l'un de l'autre sur le même brin d'ADN, et autocomplémentaires (structure palindromique) ; ceux-ci sont donc susceptibles de s'apparier et de donner une structure en épingle à cheveux. Cette séquence est immédiatement suivie d'une série plus ou moins longue de paires de bases A-T. La complémentarité interne dans l'ADN se retrouvant évidemment au niveau de l'ARN, le mécanisme de terminaison est le suivant : dès que l'ARN polymérase a transcrit cette région, l'ARN naissant s'organise localement en une double hélice stable, ce qui constitue pour l'enzyme un signal d'arrêt de son travail. L'ARN se décroche de sa matrice d'autant plus facilement qu'il n'est alors que très faiblement retenu, en raison de la complémentarité entre la série terminale de U qu'il possède et la série de A correspondante dans l'ADN. Un autre processus de terminaison de la transcription existe aussi chez les Procaryotes, qui ne sera pas développé ici ; il met en œuvre une protéine qui se fixe sur l'ARN et le chasse du complexe ARN polymérase/ADN.

Les enzymes et les signaux intervenant dans la transcription chez les Eucaryotes sont, à tous points de vue, nettement plus complexes que ceux décrits ici ; ils seront traités dans le chapitre 8.

5.2. Éléments de régulation de l'expression des gènes chez les Bactéries

Plus que tous les autres êtres vivants qui possèdent un milieu intérieur, les êtres unicellulaires (et donc les Bactéries) sont très sensibles aux variations de l'environnement. Pour survivre, ceux-ci doivent s'adapter rapidement à des modifications de la composition chimique ambiante, en particulier celle de leurs sources alimentaires. Malgré leur simplicité d'organisation, liée à une relativement faible quantité d'information génétique, les Bactéries ont développé au cours de l'évolution des mécanismes efficaces pour stopper ou induire la synthèse d'enzymes, en fonction de besoins instantanés.

Deux exemples permettent d'illustrer ceci.

• Lorsqu'une souche de *E. coli* croissant dans un milieu qui contient du glucose est transférée dans un autre milieu, contenant du lactose, on constate qu'elle se met à fabriquer en quelques minutes une enzyme nommée **β galactosidase**, qui était indétectable jusque-là. Cette enzyme permet l'utilisation du lactose en clivant cette molécule en ses deux constituants de base : le glucose et le galactose ; du point de vue nutritif, la cellule est ainsi ramenée à la situation précédente, où elle utilisait le glucose. Si les bactéries sont remises en présence de ce composé, en l'absence de lactose, on constate la disparition rapide de l'activité β galactosidase qui avait été induite.

• Lorsqu'une souche prototrophe de *E. coli* est cultivée sur un milieu minimum, sans autre apport carboné qu'un sucre simple, elle fabrique tous ses constituants organiques à partir de ce dernier, et en particulier tous ses acides aminés (voir plus haut). Si le tryptophane, par exemple, est ajouté au milieu de culture, la cellule cesse de fabriquer toutes les enzymes qui interviennent dans la synthèse de cet acide aminé, à partir de molécules plus simples. Les enzymes présentes au moment du changement de milieu persistent et continuent à fonctionner mais elles sont très rapidement diluées et dégradées dans les cellules, au cours des divisions. Nous verrons que ce système de régulation opère au niveau transcriptionnel, et comme la durée de vie des ARNm bactériens est très brève, le mécanisme est opérationnel presque instantanément. Si l'on supprime le tryptophane du milieu, le phénomène fait l'objet d'une réversion.

Ces deux situations permettent de définir deux grands modes de régulation de l'expression des gènes chez les Bactéries : la régulation par **induction** et la régulation par **répression**. Leurs mécanismes ont été élucidés grâce à l'utilisation de nombreux mutants ainsi qu'à l'emploi judicieux de systèmes d'échange de matériel génétique (conjugaison, transduction et sexduction) et l'obtention de diploïdes partiels pour la réalisation de tests de dominance et de complémentation. Nous verrons que ces deux types de régulation sont basés sur le principe de l'utilisation d'une protéine bloquant la transcription, en se fixant sur l'ADN au niveau du promoteur ; il s'agit d'une **régulation négative**.

On oppose ce mécanisme à celui basé sur l'utilisation de protéines qui, au contraire, par leur fixation à l'ADN, activent la transcription en stimulant

le fonctionnement des promoteurs ; il s'agit alors d'une **régulation positive**. Ces deux modes de contrôle peuvent en fait participer simultanément à la modulation de l'expression d'un même gène. Si, chez les Procaryotes, la régulation négative est le système le plus largement utilisé, en revanche, la régulation positive est la règle chez les Eucaryotes ; cette notion sera illustrée dans le chapitre 8.

5.2.1. Systèmes inductibles

L'exemple qui a historiquement permis de dégager ce concept est celui de l'**opéron lactose**, étudié au début des années 60 par F. Jacob et J. Monod. Lorsqu'une souche de *E. coli* est cultivée sur un milieu dépourvu de lactose, la β galactosidase est pratiquement absente des cellules. En présence de lactose, au contraire, le nombre de copies d'enzyme par cellule atteint 3 000 unités : on dit que le lactose est un **inducteur**, dans ce système. Il a été vérifié que les molécules d'enzyme sont bien néosynthétisées et que l'activité observée ne résulte pas de la modification de molécules inactives préexistantes. L'addition de lactose au milieu de culture augmente également la quantité de deux autres enzymes : la **β galactoside perméase**, qui permet le transport des galactosides à travers la membrane plasmique (voir chapitre 6), et la **thiogalactoside transacétylase**, dont le rôle physiologique reste peu clair. Cette induction coordonnée tient à l'organisation particulière de ces trois gènes, qui appartiennent à un même opéron.

Il n'est pas possible de décrire ici toutes les analyses génétiques ayant permis d'élaborer le modèle de régulation par induction, qui a été confirmé par la biochimie et la biologie moléculaire. Deux types majeurs de mutants ont été obtenus :

– des mutants affectant les **gènes de structure** des protéines, chez lesquels la fonction est altérée : mutant dits z^- (pour la β galactosidase) et y^- (pour la perméase) ;
– des mutants chez qui les enzymes sont normales mais dont le contrôle est très perturbé : **mutants** dits **constitutifs**, car les enzymes sont toujours présentes dans la cellule, même en l'absence de lactose, ou bien **mutants** dits **hyper-réprimés**, qui ne sont plus inductibles par le lactose.

Les mutations correspondant à cette dernière catégorie de souches ont été localisées au niveau de deux segments d'ADN situés d'un même côté par rapport aux deux gènes de structure z et y. On appelle i et o ces deux segments et i^- et o^- les mutants en question. L'ensemble des observations faites sur ce modèle a conduit les auteurs à proposer l'interprétation suivante, qui constitue l'essence du système inductible (voir *figure* 4.12).

• Le gène i est un **gène régulateur** qui commande la synthèse d'une protéine empêchant normalement, en l'absence de lactose, l'expression des gènes de structure ; cette protéine appelée **répresseur** a pour propriété de se fixer sur le segment o du chromosome, ce qui a pour effet d'empêcher l'expression. Ce segment o, dit **opérateur**, fait partie de la région promotrice commune aux trois gènes, le rôle du répresseur fixé étant d'empêcher la fixation et/ou le passage de l'ARN polymérase à ce niveau. L'opérateur est en grande partie transcrit et sa séquence se retrouve dans la région *leader* de l'ARNm polygénique.

• Pour exercer son action régulatrice, le répresseur est amené à reconnaître et à fixer spécifiquement le lactose, ce qui a pour effet de modifier sa conformation et de le rendre inapte à la fixation sur le segment opérateur. Le répresseur est donc une molécule remarquable possédant deux sites de reconnaissance, l'un pour l'ADN et l'autre pour le lactose, et ces deux sites interagissent puisque la fixation du lactose sur le second modifie le premier (allostérie).

Ce modèle permet de comprendre l'origine des phénotypes liés aux mutations o^- et i^- décrites plus haut :

– une mutation o^- altère la séquence de l'opérateur, qui n'est plus reconnue par le répresseur normal : la transcription a lieu de façon permanente (souche constitutive) ;
– une mutation i^- peut conduire à une modification de structure du répresseur qui n'est plus capable de se fixer sur l'opérateur (qu'il y ait du lactose ou pas), et par conséquent la transcription devient aussi constitutive ;
– d'autres types de mutations affectent le répresseur de telle sorte que son site de fixation du lactose soit atteint, mais pas le site de fixation à l'ADN, comme dans le cas précédent. Dans ces conditions, le répresseur reste toujours fixé sur l'opérateur et la souche est réprimée en permanence puisque le lactose, même présent, ne peut agir (souches hyper-réprimées).

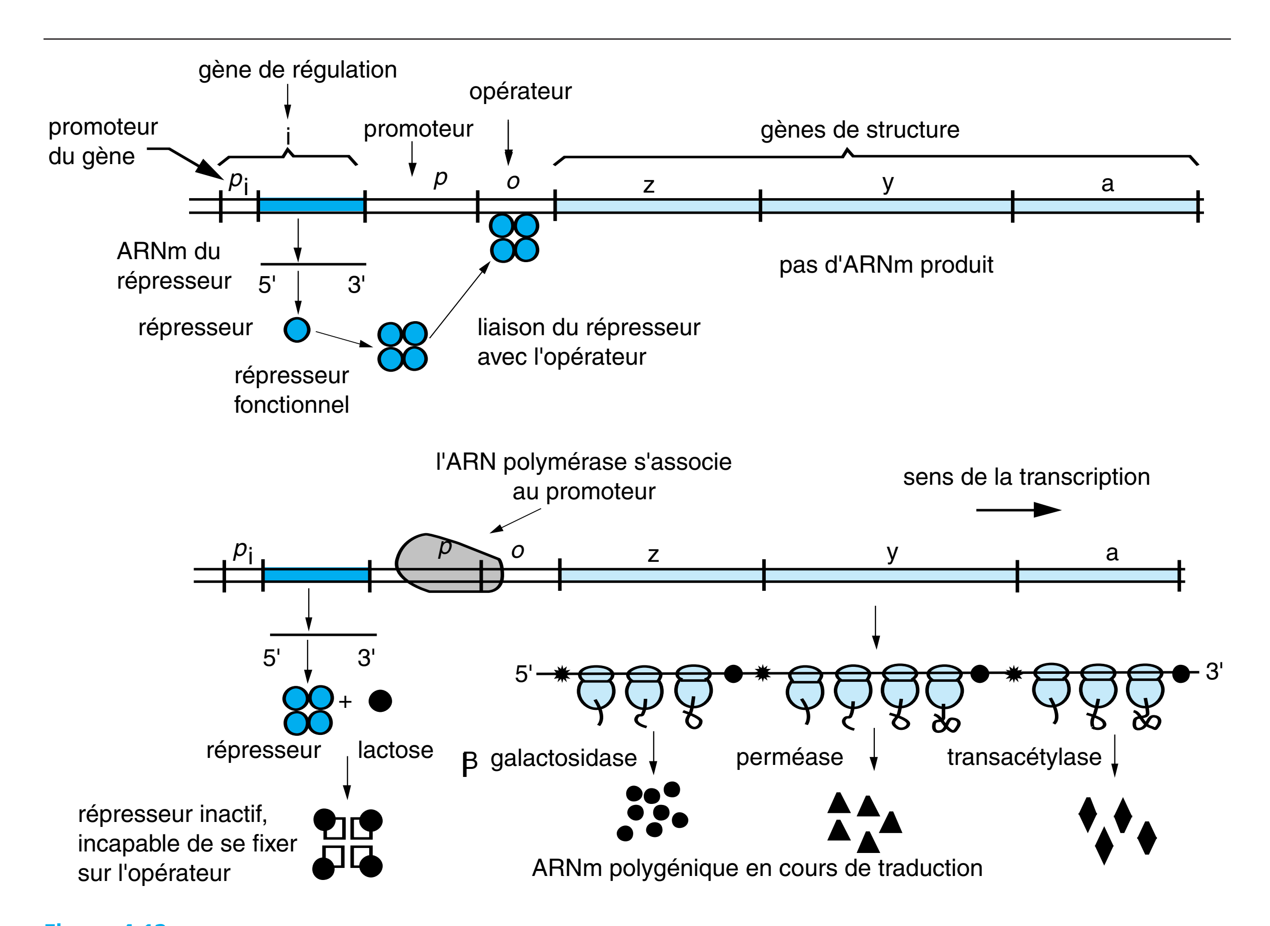


Figure 4.12

Structure et fonctionnement de l'opéron lactose chez *E. coli*

Les trois gènes de structure sont sous le contrôle d'un seul système promoteur/opérateur. Le gène de régulation, qui code la protéine régulatrice, ou répresseur, est situé à proximité immédiate de l'opéron. Il s'agit d'un opéron inductible, sous le contrôle du lactose.

Le répresseur a été isolé et purifié quelques années après que ce modèle ait été proposé, malgré la rareté du nombre de copies de cette molécule dans chaque cellule ; il s'agit d'une protéine tétramérique de masse moléculaire égale à 152 kDa (les quatre sous-unités sont identiques, car il y a un seul gène i). On considère qu'il n'y a pas plus de 10 tétramères par cellule ; la transcription du gène i n'est pas elle-même régulée (gène constitutif) et elle est très faible, la stabilité de la protéine étant relativement importante. Ce type de régulation par induction a été généralisé à plusieurs autres opérons bactériens impliqués dans le catabolisme de divers composés servant d'aliments aux cellules. L'économie que ce contrôle permet de réaliser est considérable car la β galactosidase représente en masse, dans les cellules induites, 3 % des protéines totales. Si chacune des 3 à 4 000 protéines bactériennes était produite dans les mêmes proportions, on obtiendrait une masse par cellule 100 fois supérieure à celle observée ! Il faut enfin signaler que l'opéron lactose fait aussi l'objet d'une régulation positive par une protéine (dite CAP) stimulant, par sa fixation sur le promoteur, le fonctionnement de l'ARN polymérase et augmentant le taux de transcription ; ce système ne peut être développé ici.

5.2.2. Systèmes répressibles

À côté des systèmes inductibles, en général spécifiques du catabolisme, il existe chez les Bactéries des mécanismes de régulation basés sur un principe identique, mais conduisant à un résultat opposé : il s'agit des systèmes répressibles. Ils ont un fonctionnement symétrique de celui des précédents, en ce sens que certaines collections d'enzymes cessent

d'être fabriquées dès qu'un ou plusieurs produits sont ajoutés au milieu de culture ; l'exemple classique est celui de la régulation de la chaîne de biosynthèse du tryptophane chez *E. coli*, qui a été présentée plus haut. En l'absence de cet acide aminé dans le milieu, la cellule synthétise toutes les enzymes nécessaires à sa biosynthèse ; si on le rajoute au milieu, il y a répression de l'expression des gènes responsables. Ceci est à nouveau compréhensible, en termes de coût énergétique pour la cellule : il n'est pas nécessaire de continuer à fabriquer du tryptophane endogène, s'il en existe une source utilisable dans le milieu. Ceci est vrai pour un grand nombre de systèmes physiologiques de type anabolique.

Comme dans le cas précédent, les gènes de structure sont organisés en un opéron, contrôlé par un seul segment promoteur/opérateur. L'opéron tryptophane compte cinq gènes de structure, qui codent cinq chaînes polypeptidiques intervenant dans cinq réactions enzymatiques. Le fonctionnement de cet ensemble est basé sur la synthèse par le gène régulateur d'un répresseur protéique inactif, appelé **aporépresseur**, qui n'est pas capable de se fixer seul sur l'opérateur ; dans ces conditions, la transcription a lieu. En présence d'un excès de tryptophane, l'aporépresseur le fixe et acquiert une configuration telle que ce dernier devient capable de reconnaître l'opérateur. La répression est donc contrôlée par une petite molécule exogène à laquelle on donne le nom de **corépresseur**. Il s'agit en général du produit final de la chaîne de biosynthèse (ici un acide aminé), mais cela peut aussi être un de ses dérivés directs, par exemple l'ARNt chargé de l'acide aminé. De même que pour l'induction, la fixation du complexe répresseur empêche l'ARN polymérase de se fixer sur l'unique promoteur de l'opéron. Il faut noter ici que le gène régulateur n'est pas localisé à proximité immédiate de l'opéron tryptophane.

Plusieurs centaines d'opérons inductibles ou répressibles ont été identifiées chez *E. coli* ; certaines variations sont possibles autour des deux schémas de base que nous avons décrits. Dans le cas de la synthèse de l'arginine, par exemple, il y a bien répression coordonnée par cet acide aminé, mais tous les gènes ne sont pas rassemblés en un seul opéron. D'autre part, dans le cas de l'opéron histidine, qui comprend neuf gènes à la suite, on constate que l'on n'obtient pas le même nombre de molécules de protéines pour les différents gènes ; il existe un gradient décroissant de l'efficacité de la traduction à partir de l'extrémité 5′ de l'ARNm, cette modulation étant sous contrôle génétique, car il existe des mutations qui la perturbent.

6. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA TRADUCTION

6.1. Ribosomes procaryotiques et eucaryotiques

6.1.1. Organisation générale des ribosomes

Les ribosomes sont des particules de taille voisine de 20 nm, apparaissant très sombres en microscopie électronique, que l'on trouve en abondance dans le cytoplasme de toutes les cellules ; il en existe plus de 15 000 dans une Bactérie, où ils représentent jusqu'à 25 % de la masse cellulaire. Leur morphologie précise a été étudiée grâce à la technique de coloration négative, couplée à des analyses immunologiques (voir *figure* 4.13). Ces particules sont exclusivement constituées d'ARN et de protéines, dans des proportions respectivement voisines de 65 % et 35 %. Ce sont des édifices supramoléculaires dans lesquels les ARN ont une configuration tridimensionnelle très précise et où les protéines contractent à la fois des liens étroits non covalents avec eux, mais aussi entre elles (structure de type quaternaire). Les ribosomes sont des édifices compacts, peu hydratés et donc relativement denses (d = 1,6).

Les ribosomes possèdent, essentiellement sur leur grosse sous-unité, deux sites majeurs de liaison pour deux ARNt adjacents ; celle-ci possède un site liant, au cours de la synthèse protéique, un ARNt associé à la chaîne polypeptidique naissante : site peptidique ou **site P**, et un site liant un ARNt chargé et libre : site amino-acyl ARNt, ou **site A**. Les ARNt ne peuvent se maintenir au niveau de ces deux sites que si un ARNm est déjà associé à la petite sous-unité, le long de laquelle il glisse. Ces sites sont si proches l'un de l'autre que les deux molécules d'ARNt sont obligées de s'apparier à des codons immédiatement adjacents le long de l'ARNm (voir plus loin).

C'est au niveau des ribosomes que se déroulent les phénomènes capitaux intervenant dans la synthèse des protéines : 1) le décryptage du message génétique contenu dans l'ARNm, pour le traduire

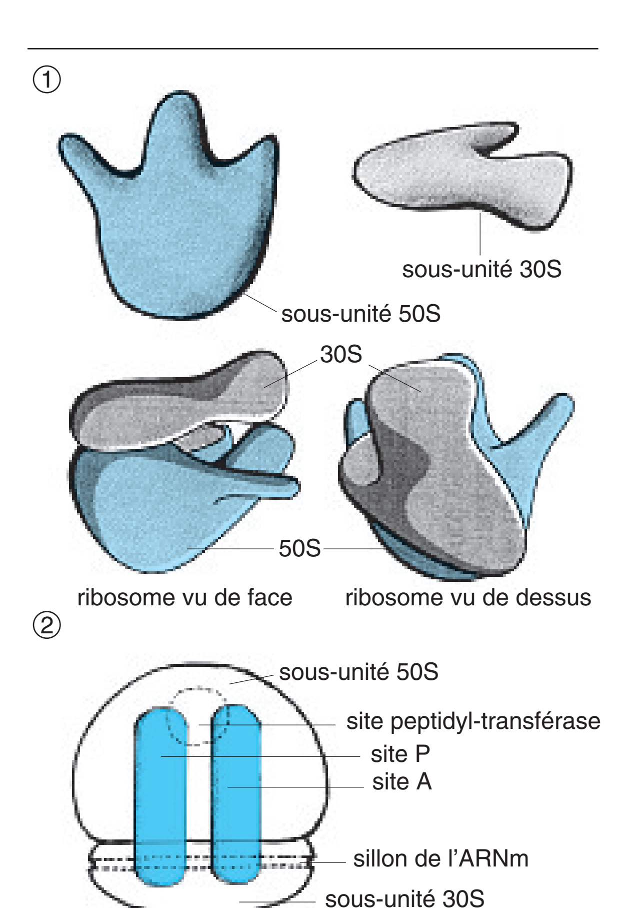


Figure 4.13

Morphologie et organisation des ribosomes

(1) Représentation actuelle des ribosomes, telle qu'elle est donnée par la coloration négative : les deux sous-unités portent des «bras» qui faciliteraient, d'une part, l'accrochage entre elles et, d'autre part, permettraient le positionnement de l'ARNm et de la chaîne polypeptidique naissante, ainsi que celui des ARNt chargés. **(2)** Schéma interprétatif de la structure d'un ribosome, montrant les deux principaux sites fonctionnels. Un troisième site mineur, dit «d'éjection», est parfois mentionné, à gauche du site P. L'ARNm glisse dans un sillon essentiellement localisé dans la petite sous-unité.

en un ordre précis des acides aminés constituant la chaîne polypeptidique, et 2) la catalyse elle-même des liaisons peptidiques et de l'allongement de la chaîne. Les ribosomes agissent en fait comme une surface catalytique sur laquelle se rencontrent l'ARNm et les ARNt chargés de leurs acides aminés. Les deux sous-unités du ribosome ne restent associées que lors du processus de synthèse protéique ; en dehors de ce cas précis, elles existent à l'état séparé. Il existe en fait un pool de sous-unités libres, en équilibre dynamique avec les formes associées, liées aux ARNm.

6.1.2. Organisation des ribosomes bactériens

Le détail de la composition et de l'organisation des ribosomes procaryotiques (coefficient de sédimentation : 70 S) est donné dans la *figure* 4.14 : leurs deux sous-unités de taille différente contiennent chacune un nombre de molécules d'ARN et de protéines différentes, bien spécifiques. De

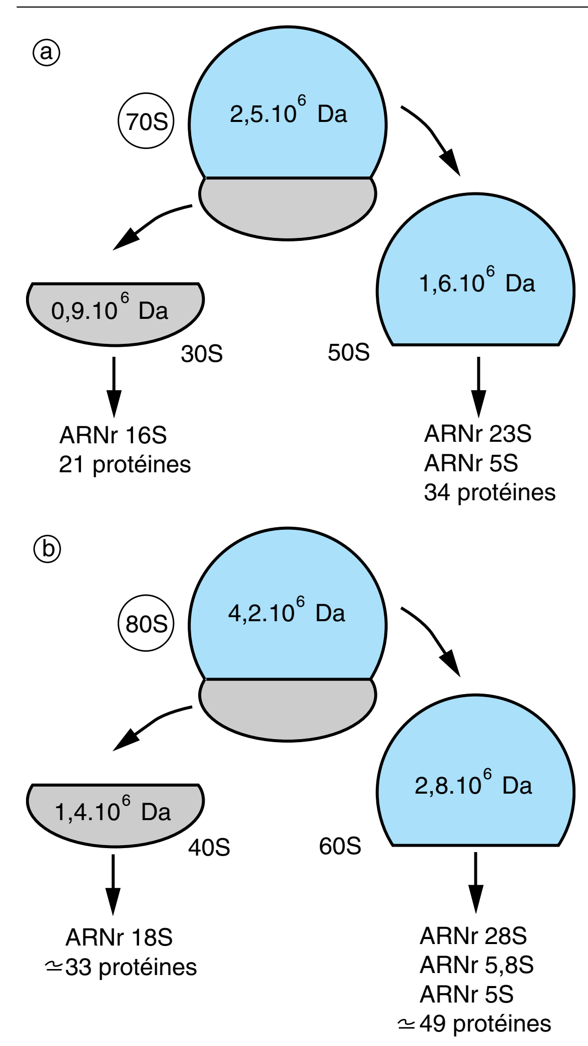


Figure 4.14

Comparaison de l'organisation des ribosomes hyaloplasmiques des Procaryotes **(a)** et des Eucaryotes **(b)**

Chez les premiers, la grosse sous-unité (50 S) contient 2 molécules d'ARNr (2 900 et 120 nucléotides) et 34 protéines, tandis que la petite (30 S) contient une seule molécule d'ARNr (1 540 nucléotides) et 21 protéines. Les ribosomes eucaryotiques sont formés de deux sous-unités de 60 S et 40 S, contenant respectivement 3 ARNr (4 700, 160 et 120 nucléotides) et 49 protéines différentes, et 1 ARNr (1 900 nucléotides) et 33 protéines différentes. Il faut bien noter que chaque molécule protéique est présente en un seul exemplaire par ribosome.

même que pour les ARN, les valeurs des coefficients de sédimentation attribuées aux ribosomes et à leurs sous-unités se réfèrent à des mesures obtenues par la centrifugation analytique. On rappelle que ces valeurs ne sont ni additives ni rigoureusement proportionnelles à la taille des particules dont la forme n'est pas du tout globulaire.

6.1.3. Organisation des ribosomes eucaryotiques

Les ribosomes eucaryotiques localisés dans le hyaloplasme sont un peu plus gros que leurs équivalents procaryotiques (80 S) ; leur organisation est donnée dans la *figure* 4.14. Nous verrons plus loin que leur localisation au sein de la cellule eucaryotique a des conséquences importantes pour ce qui concerne la destinée des protéines qu'ils fabriquent. En raison de leurs différences structurales, et de leurs implications fonctionnelles, ces ribosomes eucaryotiques ne sont pas sensibles aux mêmes poisons, ou drogues, que ceux des Procaryotes. En particulier, les antibiotiques antibactériens qui agissent au niveau des mécanismes de la traduction, restent pour la plupart sans effet chez les Eucaryotes (voir plus loin).

Les ribosomes des organites semi-autonomes : mitochondries et plastes, ont des caractéristiques spécifiques, différentes à la fois de celles des Procaryotes et de celles des ribosomes hyaloplasmiques eucaryotiques. Par leur taille et leurs propriétés fonctionnelles, les **plastoribosomes** sont très proches des ribosomes procaryotiques, tandis que les **mitoribosomes** sont souvent plus petits que ces derniers. Ces ribosomes sont en général sensibles aux antibiotiques antibactériens (voir plus loin). Les données relatives aux divers ARNr des organites sont résumées dans le *tableau* 4.2.

	petite sous-unité	grosse sous-unité
mitochondries animales	12S	16S
mitochondries végétales	18S	5S ; 26S
mitochondries des Champignons	15S	21S
mitochondries des Protistes	13-14 S	20S ; 5,8S
plastes des Végétaux	16S	4,5S ; 5S ; 23S

Tableau 4.2
Tailles des différents ARNr rencontrés dans les ribosomes des organites semi-autonomes
Quelques exemples sont pris chez divers Protistes (*Tetrahymena*, *Paramecium* et *Didinium*), les Champignons, les Végétaux et les Animaux.

6.2. Mécanismes de la traduction

Les mécanismes fondamentaux de la traduction sont très voisins chez les Procaryotes et les Eucaryotes ; quelques remarques spécifiques de détail seront cependant faites, relatives au fonctionnement des ribosomes eucaryotiques. Il faut signaler dès à présent que l'expression des gènes, chez tous les êtres vivants, peut être régulée au niveau traductionnel, et pas seulement transcriptionnel ; un exemple illustratif sera traité dans le chapitre 8.

Les différentes étapes de la synthèse d'une chaîne polypeptidique se déroulent grâce aux partenaires suivants, qui doivent être réunis pour agir : 1) un ribosome (au moins), 2) un ARN messager, 3) la panoplie des différents ARNt chargés ou **aminoacyl-ARNt**, et 4) divers facteurs protéiques, ainsi qu'une source d'énergie, sous forme de GTP.

6.2.1. Charge des ARNt

La liaison qui accroche un acide aminé à un ARNt est de type ester, avec élimination d'eau entre le COOH du premier et une fonction OH du ribose du dernier nucléotide (AMP) de l'ARNt. La réaction est catalysée par une enzyme nommée **aminoacyl-ARNt synthétase**, qui a une double spécificité de substrat, puisqu'elle ne doit coupler un acide aminé donné qu'à une molécule d'ARNt précise (ou un nombre très limité de molécules voisines d'ARNt). Il existe seulement vingt espèces de synthétases différentes, une pour chaque espèce d'acide aminé trouvé dans les protéines.

La réaction d'accrochage se fait en deux étapes et exige une molécule d'ATP, qui fournit l'énergie nécessaire. L'acide aminé est d'abord activé sous forme d'acide aminé adénylé (ou **aminoacyl-AMP**), et c'est ce dernier qui sera lié à l'ARNt avec libération simultanée d'AMP ; la synthétase catalyse ces deux opérations successivement, et l'acide

aminé activé intermédiaire ne quitte pas la surface de l'enzyme. Dans un ARNt chargé, la liaison ester unissant les deux molécules est originale en ce sens qu'elle est riche en énergie. Il est important de noter ceci car on verra que c'est cette seule énergie qui sera utilisée pour réaliser la liaison peptidique (réaction endergonique) ; autrement dit, l'ARNt chargé apporte au ribosome, non seulement l'acide aminé, mais aussi l'énergie nécessaire à sa liaison.

Le rôle de l'aminoacyl-ARNt synthétase est fondamental dans le processus de décryptage du code génétique car elle assure la spécificité de la reconnaissance entre un ARNt et un acide aminé particulier. Le rôle d'adaptateur attribué généralement aux seuls ARNt doit être étendu à cette catégorie de protéines, dont la fonction est au moins aussi importante, dans la conversion d'une séquence nucléotidique en une séquence d'acides aminés. Ces enzymes sont capables de corriger des erreurs qu'elles auraient pu faire en associant un mauvais ARNt à un acide aminé donné ; elles hydrolysent en effet les complexes anormaux malencontreusement formés, au niveau d'un site catalytique différent du site de synthèse.

6.2.2. Démarrage de la traduction

La rencontre d'un ribosome avec un ARNm initie une série complexe d'événements dont le résultat est de placer correctement le ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm. C'est de ce côté du message que se situe en effet le codon de démarrage de la lecture, qui est un codon AUG, spécifiant l'acide aminé méthionine. Il existe, au niveau de cette étape de la traduction, des différences entre les mécanismes procaryotiques et eucaryotiques.

• Chez les Procaryotes, le démarrage commence avec la fixation spontanée de la petite sous-unité du ribosome à l'extrémité 5' P de l'ARN messager, grâce à la séquence consensus, dite de Shine-Dalgarno, que porte ce dernier. La précision du positionnement est telle que le codon AUG se trouve parfaitement à sa place, au niveau du site P incomplet porté par cette sous-unité ; c'est lui qui permet de choisir le bon cadre de lecture, parmi les trois différents qui existent, en raison du principe du codage par triplets. Lorsque ce complexe est réalisé, un $ARNt^{met}$ particulier chargé d'une méthionine vient se fixer sur le codon AUG, grâce à son anticodon spécifique ; cette méthionine est spéciale en ce sens qu'elle est formylée (car ayant un acide formique greffé sur son NH_2). Ce processus nécessite l'intervention de trois facteurs protéiques spécifiques dont le rôle ne sera pas détaillé ici ; c'est à ce moment- là seulement qu'une grosse sous-unité libre vient s'associer au complexe précédent pour constituer un ribosome complet et fonctionnel. Le site A du ribosome étant alors encore libre, il peut accepter un ARNt chargé (n°2) correspondant au codon situé immédiatement à côté du codon AUG, du côté 3' OH ; la phase d'élongation peut ainsi s'engager.

• Chez les Eucaryotes, le premier ARNt chargé impliqué est un $ARNt^{met}$ spécifique porteur d'une méthionine non formylée ; celui-ci se fixe sur la petite sous-unité 40 S non encore liée à l'ARNm. Cette étape est alors suivie de la reconnaissance, par le complexe ainsi formé, de l'extrémité 5' P de l'ARNm, «chapeautée» par une molécule de méthyl-guanosine, qui sert de signal de positionnement (voir chapitre 8). La sous-unité glisse ensuite le long de l'ARNm jusqu'à ce qu'elle rencontre le premier codon AUG. En raison de ce mécanisme, aucun autre codon AUG dans la séquence de l'ARNm ne pourra être utilisé comme codon de départ ; en conséquence, une seule espèce de chaîne polypeptidique est synthétisée à partir d'un ARNm donné chez les Eucaryotes.

Contrairement à ce qui se passe chez les Bactéries, où les ribosomes peuvent se fixer en amont de codons d'initiation AUG internes à un ARNm polygénique (dans les espaces intercistroniques), les ARNm eucaryotiques sont nécessairement monogéniques. Dès que le codon AUG est atteint par la sous-unité 40 S et que l'$ARNt^{met}$ est en place, la sous-unité 60 S complète le système qui peut démarrer la lecture. Tous ces processus impliquent l'intervention de facteurs protéiques, qui sont en nombre supérieur à ceux rencontrés chez les Bactéries (huit, au moins, dans les réticulocytes sanguins).

6.2.3. Élongation de la chaîne polypeptidique

Le premier acide aminé étant en place, le décryptage de l'ARNm par le ribosome se fait de 5' vers 3', codon après codon, de manière identique chez les Procaryotes et les Eucaryotes ; les étapes de l'élongation sont schématisées dans la *figure* 4.15. Le deuxième ARNt chargé vient donc se loger à côté du premier, au niveau du site A, saturant ainsi la grosse sous-unité du ribosome. De même que pour l'initiation, des facteurs pro-

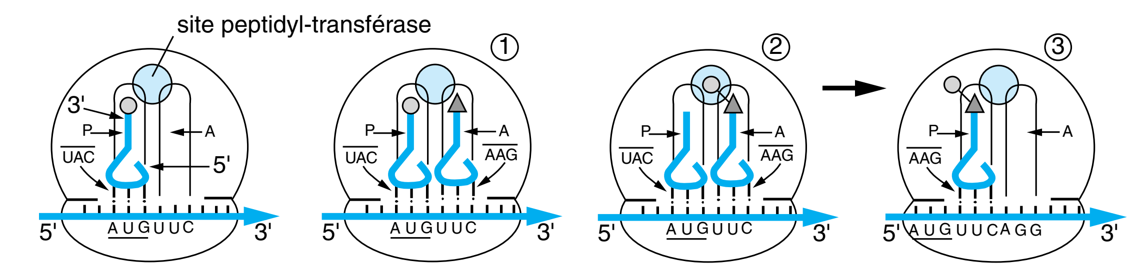


Figure 4.15

Différentes étapes de l'élongation d'une chaîne polypeptidique

Le schéma illustre la formation du dipeptide N-terminal : Mét.-Phé. (codons AUG et UUC). Chaque cycle fonctionne sur le même principe : **(1)** arrivée d'un ARNt chargé pour lire le codon au site A ; **(2)** liaison peptidique ; **(3)** translocation.
La flèche en gras indique le sens de la translocation du ribosome.

téiques variés interviennent dans ce processus, et en fait l'ARNt chargé n'est pas seul, mais toujours associé à un facteur d'élongation servant de transporteur (avec lequel il s'installe dans le site A).

L'étape capitale suivante est la synthèse de la liaison peptidique entre le COOH de la méthionine et le NH_2 libre du nouvel acide aminé ; or il faut se souvenir que le COOH de la méthionine est jusqu'ici impliqué dans son accrochage avec l'ARNt^{met}. Comme on l'a dit plus haut, c'est la rupture de cette liaison qui fournit l'énergie nécessaire à la réalisation de la liaison peptidique. Le résultat est que : 1) l'ARNt^{met} est déchargé et il se décroche de l'ARNm, puis se dégage du site P ; 2) un dipeptide est formé, qui a une extrémité NH_2 libre, et dont l'extrémité COOH est toujours liée à l'ARNt n°2 ; cet ARNt reste lié à l'ARNm par son anticodon au niveau du site A ; 3) le site P du ribosome est donc libre tandis que le site A reste occupé par le **dipeptidyl-ARNt**.

On appelle activité **peptidyl-transférase** la capacité enzymatique de la grosse sous-unité du ribosome à associer de façon covalente deux acides aminés entre eux. On ne connaît pas les détails de cette réaction enzymatique ; il est en fait vraisemblable que l'ARNr 23 S (ou 28 S) est l'acteur principal dans la catalyse de cette liaison (rôle de **ribozyme** ; voir chapitre 16). L'étape suivante, nécessaire pour que la synthèse se poursuive, est le déplacement relatif de l'ARNm par rapport au ribosome, ou **translocation** ; ce dernier se décale dans son ensemble d'un cran, correspondant à un codon le long de l'ARNm, vers l'extrémité 3'OH. Un autre facteur d'élongation est indispensable pour cette étape.

La double conséquence de cet événement est que : 1) le dipeptidyl-ARNt se trouve maintenant au niveau du site P du ribosome, et 2) le site A de ce dernier est simultanément à nouveau libre et c'est le codon n° 3 de l'ARNm qui est exposé à son niveau. À la suite de la translocation, on se retrouve donc exactement dans la même situation qu'au début de ce qu'on vient de décrire, et la succession des mêmes événements se reproduit :

– arrivée au site A d'un nouvel ARNt (n° 3) chargé qui reconnaît, grâce à son anticodon, le codon n° 3 de l'ARNm ;
– formation de la liaison peptidique et synthèse d'un tripeptide qui reste accroché à l'ARNt n° 3 ;
– éjection de l'ARNt n° 2 déchargé et nouvelle translocation du ribosome, d'un cran, vers l'extrémité 3'OH de l'ARNm.

Et ainsi de suite : l'élongation de la chaîne polypeptidique correspondant à la totalité du message est la succession régulière de tels cycles. À chaque cycle, de l'énergie est dépensée au niveau du ribosome pour effectuer toutes ces opérations, en particulier la translocation, sous la forme de l'hydrolyse de deux molécules de GTP (molécule riche en énergie, au même titre que l'ATP). Le ribosome est donc formellement une sorte de «tête de lecture» qui parcourt l'ARNm dans le sens 5'→3' et le décode simultanément, triplet après triplet. Il faut environ 20 secondes pour fabriquer une chaîne de 400 acides aminés. La chaîne naissante est toujours associée au ribosome par son COOH alors que son autre extrémité NH_2 reste libre. La colinéarité : chaîne polypeptidique/chaîne nucléotidique de l'ARNm, s'établit donc de la façon suivante : l'extrémité NH_2 de la première correspond à

l'extrémité 5' P de la deuxième, l'extrémité COOH correspondant évidemment à l'extrémité 3' OH.

6.2.4. Terminaison de la traduction

Parmi les 64 codons possibles, trois n'ont pas de sens en termes d'acides aminés ; ce sont des codons de terminaison, ou **codons stop** : UAA, UAG, UGA. Lorsqu'un ribosome arrive à leur niveau, le long de l'ARNm, aucun ARNt ne peut venir s'apparier à eux dans le site A, car il n'en existe pas possédant l'anticodon correspondant. On a montré, chez tous les êtres vivants, l'existence de plusieurs facteurs protéiques ayant la capacité à venir se loger spécifiquement au niveau du site A, lorsqu'un des trois codons stop apparaît. Cette liaison a pour effet que la chaîne polypeptidique est décrochée du dernier ARNt chargé, par hydrolyse au niveau de son extrémité COOH ; celle-ci se trouve donc libérée, soit dans le hyaloplasme, soit dans le réticulum endoplasmique, soit directement à l'extérieur de la cellule (s'il s'agit d'une Bactérie) (voir plus loin). La libération du dernier ARNt déchargé s'accompagne de la dissociation du ribosome en deux sous-unités libres qui vont rejoindre le pool de sous-unités hyaloplasmiques. Celles-ci sont prêtes à recommencer un nouveau cycle de synthèse protéique ; l'ARNm a simultanément été lui aussi libéré.

À mesure que la chaîne polypeptidique s'allonge, au cours de la progression du ribosome le long de l'ARNm, elle commence à se replier dans l'espace et à acquérir ses structures tridimensionnelles II et III caractéristiques. Nous verrons, dans le chapitre 9, qu'en réalité ce phénomène n'est généralement pas spontané, contrairement à ce qu'on a longtemps cru, et que des protéines spécifiques (**protéines chaperons**), participent à ce processus.

6.2.5. Action des inhibiteurs de la traduction

La complexité de la machinerie et du mécanisme traductionnel les rend particulièrement sensibles à un grand nombre de composés d'origine biologique ou synthétique, qui agissent comme des poisons de la synthèse protéique. Parmi ceux-ci, les antibiotiques sont les plus répandus.

Encart biomédical

Antibiotiques et synthèse protéique

Les antibiotiques naturels sont des composés de faible masse moléculaire, produits en général par des micro-organismes (Bactéries ou Champignons) et qui, en diffusant dans l'environnement, inhibent la croissance, ou même tuent d'autres espèces de micro-organismes. Ils sont en général efficaces à de très faibles concentrations et jouent un rôle important dans la compétition entre êtres vivants concurrents, vivant dans le sol ou les eaux. Leurs modes d'action sont très divers ; certains ont pour cible les membranes bactériennes, d'autres empêchent la synthèse de la paroi cellulaire, d'autres encore inhibent la réplication de l'ADN ou sa transcription. Un grand nombre agit aussi spécifiquement sur le processus de traduction bactérienne, au niveau de différentes étapes. Parmi les plus connus, on peut citer :

- la **tétracycline**, qui bloque la liaison de l'aminoacyl-ARNt au site A de la sous-unité 50 S ;
- la **streptomycine**, qui se fixe sur la sous-unité 30 S et entraîne des erreurs de lecture de l'ARNm ;
- le **chloramphénicol**, qui inhibe la réaction de la peptidyl-transférase ;
- l'**érythromycine**, qui bloque la translocation du ribosome.

L'utilisation médicale des antibiotiques comme substances antibactériennes exploite entre autres les différences structurales, et donc fonctionnelles, qui existent entre les ribosomes des Procaryotes et ceux des Eucaryotes ; en effet, ces substances, qui sont actives contre les ribosomes des premiers, restent sans effet sur les ribosomes hyaloplasmiques et la traduction chez les Eucaryotes. C'est pour cette raison que ces composés sont des médicaments aussi efficaces contre les infections bactériennes, car on peut les utiliser à des doses relativement massives sans qu'il en résulte une trop forte toxicité immédiate pour nos organismes. Cependant, on observe des effets secondaires (parfois graves), qui découlent du fait que les ribosomes spécifiques des mitochondries de nos cellules sont le plus souvent sensibles à ces antibiotiques antibactériens ; on ne peut pas bloquer impunément la synthèse des protéines au sein de ces organites sans les altérer. Ce phénomène reflète l'origine procaryotique de ces organites (voir chapitre 16).

Ces propriétés remarquables de sélectivité des inhibiteurs de la synthèse protéique au niveau des ribosomes sont très utiles dans la recherche expérimentale en biologie, car elles permettent de distinguer dans les cellules eucaryotiques les mécanismes de synthèse protéique propres à leurs différents compartiments. Par exemple, le **chloramphénicol** n'inhibe que la synthèse protéique liée aux mitochondries ou aux chloroplastes, tandis que la **cycloheximide** ou l'**anisomycine** n'agissent que sur les ribosomes 80 S du hyaloplasme. Il existe aussi d'autres antibiotiques non spécifiques, inhibant la synthèse protéique chez tous les êtres vivants, au niveau de toutes leurs catégories de ribosomes, comme la **puromycine**.

6.3. Transcription et traduction simultanées chez les Procaryotes

Chez les Procaryotes, l'absence de systèmes membranaires et de compartimentation fait que le matériel génétique est directement en contact avec le cytoplasme, et donc avec les ribosomes qu'il contient. Ceci a pour conséquence directe que la synthèse des protéines peut démarrer sans délai sur un ARNm qui vient juste d'être transcrit sur l'ADN. En fait, comme c'est l'extrémité 5′ P de l'ARNm qui est libérée la première au cours de la transcription, et qui sert aussi de point de départ de la traduction, les ribosomes ont la possibilité de s'associer aux ARNm avant que ces derniers soient complètement terminés ; leur extrémité 3′ OH est encore accrochée à l'ADN par l'ARN polymérase alors que l'extrémité 5′ P est déjà décodée. La progression de l'ARN polymérase et celle des ribosomes le long de l'ARNm se font sensiblement à la même vitesse : 14 ou 15 codons synthétisés ou décodés par seconde. Ce phénomène est appelé : **transcription et traduction simultanées**, et il est très fréquemment rencontré chez les Bactéries, en particulier celles dont la croissance est rapide. En revanche, l'existence du noyau chez les Eucaryotes conduit à la séparation de ces deux processus fondamentaux ; les conséquences en seront en fait considérables (voir chapitre 8).

Dès que l'extrémité 5′ P de l'ARNm est libérée par le premier ribosome qui a un peu progressé vers l'autre extrémité, un autre vient se fixer à ce niveau, et ainsi de suite, de sorte qu'un seul ARNm porte un grand nombre de ribosomes qui le décodent simultanément. Cette structure constituée de nombreux ribosomes disposés en « train » sur un seul ARNm est appelée un **polyribosome** ou **polysome**. La longueur de la chaîne polypeptidique naissante associée à chaque ribosome est proportionnelle à la distance parcourue par celui-ci le long de la séquence codante de l'ARNm. Comme plusieurs ARN polymérases fonctionnent simultanément sur le même gène, ces polysomes sont associés en « grappes » à l'ADN bactérien. Des images spectaculaires de ce phénomène ont été obtenues en microscopie électronique (voir *figure* 4.16), après étalement délicat de nucléoïdes bactériens sur des supports appropriés et ombrage métallique (voir chapitre 3).

Ces processus contribuent à amplifier l'information génétique au moment de son expression et permettent de comprendre comment un seul ARNm peut fabriquer en peu de temps un très grand nombre de copies identiques de la même

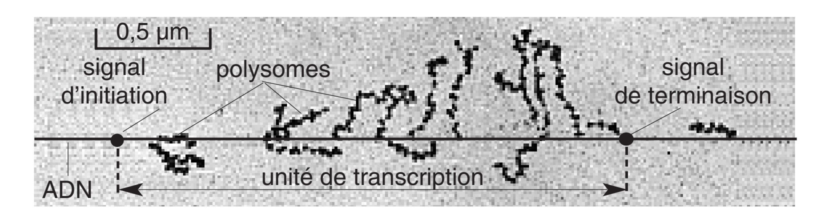


Figure 4.16

Phénomène de transcription-traduction simultanées chez les Bactéries

La fibre axiale est constituée par la molécule l'ADN nu, d'où partent des bras latéraux représentant des ARNm en cours de transcription, recouverts de ribosomes. Les molécules d'ARNm sont d'autant plus longues que le processus de transcription est avancé, ce qui indique le sens de progression de l'ARN polymérase (vers la droite du schéma). Le segment d'ADN ainsi transcrit en un seul ARNm constitue une unité de transcription correspondant, le plus souvent, à plusieurs gènes de protéines ; les zones probables des signaux sont figurées sous forme de deux points. (D'après un cliché de O. Miller, 1970).

protéine. Dans le cas de l'opéron tryptophane de *E. coli*, qui correspond à une unité de transcription de 7 000 nucléotides pour les cinq gènes, on calcule que quinze molécules d'ARN polymérase environ transcrivent simultanément l'ADN, et que trente ribosomes fonctionnent sur chaque ARNm. Si on admet un événement d'initiation de la transcription toutes les 12 secondes, et les valeurs données plus haut pour la traduction, la production est d'environ 150 molécules par minute, pour une protéine donnée de cet opéron.

Malgré leur simplicité d'organisation, on est néanmoins amené à distinguer, chez les Procaryotes, trois localisations possibles pour leurs polysomes : ceux qui restent accrochés au nucléoïde, ceux qui fonctionnent en étant libres dans le cytoplasme, et ceux qui sont accrochés à la face interne de la membrane cytoplasmique, et participent à la sécrétion des protéines dans le milieu extérieur (voir plus loin).

6.4. Caractères spécifiques de la traduction chez les Eucaryotes

Lorsqu'on s'intéresse aux événements situés en aval du mécanisme initial de synthèse de la chaîne polypeptidique, il existe une différence très importante entre les Procaryotes et les Eucaryotes. Chez tous les êtres vivants, les protéines fabriquées par les cellules ont deux destinations possibles :

– soit elles restent dans la cellule elle-même, dissoutes dans le cytoplasme ou dans la lumière des organites, ou bien intégrées dans des systèmes membranaires : essentiellement la membrane plasmique, chez les Bactéries (et les sacs thylakoïdiens des Cyanobactéries et des autres Bactéries photosynthétiques) et les diverses membranes des multiples organites des cellules eucaryotiques ;
– soit elles sont sécrétées dans le milieu extérieur, où elles assurent des fonctions extrêmement variées (protection, digestion, signalisation…).

Ce dernier phénomène reste d'ampleur limitée chez les Procaryotes : les rares protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire sont alors fabriquées sur les polysomes associés à la membrane cytoplasmique, grâce à des mécanismes moléculaires voisins de ceux qui seront décrits en détail pour les Eucaryotes, dans le chapitre 9. Cependant, alors que les protéines bactériennes sont directement sécrétées sans avoir subi de modification chimique, les protéines eucaryotiques connaissent, entre le moment de la synthèse de la chaîne polypeptidique et l'émission à l'extérieur, un long trajet intracellulaire accompagné de multiples remaniements ou additions de composés divers. La microscopie électronique montre qu'il existe, dans le cytoplasme des cellules eucaryotiques, deux catégories de ribosomes différant non pas par leur nature, mais par leur localisation : une partie semble flotter librement dans le hyaloplasme, sous forme de **polysomes libres**, tandis que l'autre est étroitement associée à la face externe des membranes du réticulum endoplasmique rugueux. Des coupes tangentielles de ce dernier montrent que les ribosomes sont ici aussi organisés en **polysomes**, dits **liés**.

Le réticulum rugueux est le lieu initial de la synthèse des protéines sécrétées ; les ribosomes qui lui sont associés sont directement responsables de la polymérisation de la chaîne polypeptidique, mais ce processus est doublé d'un mécanisme simultané de pénétration de la chaîne naissante dans la cavité de cet organite, à travers sa membrane. Ce mécanisme, valable également pour les protéines membranaires et lysosomales, est appelé **insertion cotraductionnelle**. Les ribosomes libres, en revanche, fabriquent des protéines dont les destinées sont très diverses, en raison de la complexité de l'organisation des cellules eucaryotiques ; celles-ci peuvent rester soit dans le hyaloplasme, soit gagner les membranes ou la lumière de très nombreux organites, autres que le réticulum : noyau, mitochondries… C'est le problème du **routage intracellulaire** des protéines, qui sera traité dans le chapitre 9.

7. ORGANISATION ET TAILLE DES GÉNOMES CHEZ LES VIRUS ET LES ÊTRES VIVANTS

7.1. Génomes des Virus

L'organisation structurale et les cycles biologiques des Virus seront présentés dans le chapitre 15. On peut cependant, dès à présent, décrire la nature, la taille et l'organisation des génomes de ces «êtres» que de nombreuses caractéristiques situent en marge du monde vivant. Il existe chez les Virus une extrême diversité de

situations puisque l'ADN, aussi bien que l'ARN, à l'état double-brin ou simple-brin tous les deux, peuvent faire office de matériel génétique. Généralement, ce génome est constitué d'une seule molécule, linéaire ou circulaire, mais il est parfois formé de plusieurs molécules linéaires, représentant autant d'unités indépendantes d'information. Le nombre de gènes est enfin très variable, soit extrêmement réduit (un ou deux gènes), ou bien très élevé (jusqu'à 200 ou 300 gènes). Le cas des Virus à ARN est intéressant au plan biologique, particulièrement ceux dits à **ARN négatif**, car leur matériel génétique est en fait complémentaire de celui d'un ARNm (qualifié d'**ARN positif**), et donc complètement inutilisable (illisible) par la cellule-hôte. Nous étudierons, dans le chapitre 15, plusieurs exemples de cycles illustrant l'étonnante diversité des situations génétiques rencontrées chez les Virus. Dans tous les cas, les cellules-hôtes ne sachant traduire que des ARNm, il faut que le matériel génétique du Virus, quelle que soit sa nature, arrive à produire cette molécule.

Quelques exemples classiques, arbitrairement classés par ordre croissant de nombre de gènes, peuvent être donnés.

• Les Parvovirus sont des Virus de Vertébrés ayant une organisation très simple et une taille réduite (par rapport à la moyenne des Virus, d'où leur nom). Leur génome linéaire est constitué d'une seule molécule d'ADN simple-brin, dont la taille, selon les cas, comprend 2 à 5 000 nucléotides ; le nombre de gènes est compris entre 3 et 5.

• Le Virus de la mosaïque du tabac a un génome d'ARN simple-brin positif, constitué d'une seule molécule de 6 395 nucléotides, possédant seulement quatre gènes.

• Le Virus de la grippe est un Virus de Vertébrés à ARN simple-brin négatif, dont le génome de $13{,}5.10^3$ nucléotides est fragmenté en huit molécules linéaires contenant douze gènes ;

• Le bactériophage T4 est un Virus de Bactéries, de grande taille et d'organisation très complexe ; son génome unique est linéaire et constitué d'ADN double-brin. La taille de cette molécule est de 165.10^3 paires de bases (soit environ 56 µm de long) et son génome comprend environ 200 gènes.

• Le Virus de la vaccine (Virus de Vertébrés) est un gros Virus, dont le diamètre est de 300-400 nm ; il possède un génome à ADN double-brin dont la taille (240.10^3 paires de bases) et le nombre de gènes sont encore supérieurs à ceux de T4.

Les Virus étant des parasites absolus de Bactéries ou de cellules eucaryotiques, leurs gènes possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles (organisation générale, signaux) semblables à celles des gènes de leurs hôtes ; cette propriété a souvent été mise à profit pour analyser le fonctionnement de ces derniers. En particulier, c'est chez les Virus animaux à ADN que l'organisation mosaïque des gènes de protéines a été mise en évidence pour la première fois (adénovirus). Les génomes viraux ne codent que des protéines, soit enzymatiques, soit de structure (de capside ou d'enveloppe). Ils ne codent jamais d'ARNr et parfois seulement quelques rares ARNt, et ils dépendent donc totalement de la machinerie de traduction des cellules-hôtes pour se multiplier.

Le premier génome complet à avoir été séquencé est celui du Virus ΦX 174 (en 1978) ; il s'agit d'un Virus à ADN simple-brin, dont le génome contient 5 386 paires de bases et onze gènes. La grande surprise de cette analyse fut que la capacité de codage de ce génome, en nombre de paires de bases, semblait inférieure à ce que l'étude des protéines fabriquées laissait prévoir. En fait, c'est un exemple rare de génome complexe où, localement, une même séquence d'ADN peut servir à coder deux protéines différentes, en utilisant deux cadres de lecture distincts (la séquence d'un petit gène est donc incluse dans un plus grand). À l'heure actuelle, des centaines de génomes viraux ont été séquencés, en raison de leur petite taille, et surtout à cause de l'intérêt que cela représente pour la lutte contre les pathologies associées à leur multiplication.

7.2. Génomes des Procaryotes

Le matériel génétique des cellules procaryotiques est constitué d'une seule molécule d'ADN double-brin dont la longueur est de l'ordre du millimètre (1,3 mm chez *E. coli*). Cette molécule est refermée sur elle-même, et est dite circulaire ; cette organisation a historiquement été déduite à partir d'expériences de génétique, avant d'être observée au microscope. Dans les cellules en croissance rapide, on peut observer deux copies identiques de cette molécule par cellule, sous forme de deux **nucléoïdes** bien distincts, aux deux extrémités de la cellule. L'ADN bactérien, longtemps considéré comme nu et baignant directement dans le cytoplasme, est recouvert de protéines basiques (diffé-

rentes des histones des Eucaryotes ; voir chapitre 8), susceptibles de s'associer étroitement à lui par des liaisons ioniques, sans toutefois l'organiser de façon très compacte. Bien qu'il n'y ait pas ici de vrais nucléosomes, on utilise cependant le terme de **chromatine bactérienne**.

Dans la cellule bactérienne, la molécule d'ADN doit être extrêmement compactée puisque sa longueur est près de 1 000 fois plus grande que celle de la cellule elle-même. Elle est en fait organisée en grandes boucles (au nombre de 50 à 100), dont les pieds sont probablement rapprochés par des protéines de liaison. Ce type de structure, qui recouvre certainement des aspects fonctionnels, est universel car nous l'évoquerons à nouveau lors de l'étude de la chromatine des Eucaryotes. Il faut enfin signaler que l'ADN est associé à la membrane cytoplasmique de la Bactérie ; ceci est lié au fait que les enzymes de réplication sont elles-mêmes membranaires et que c'est la seule façon chez les Bactéries, qui n'ont pas d'appareil mitotique, d'assurer la ségrégation des molécules filles après la réplication (voir chapitre 12).

L'étendue des tailles des génomes chez les Procaryotes va de 0,6 à 13.10^6 paires de bases. Les plus petits d'entre eux sont rencontrés chez les **Mycoplasmes**, qui sont des parasites de cellules animales ou végétales. Ces formes, très simplifiées par rapport aux formes libres (c'est une constante chez les parasites), ont des génomes possédant seulement 3 à 4 fois plus de gènes que les génomes viraux les plus complexes (environ 750). Les Bactéries les plus courantes, libres, ont des génomes 3 à 10 fois plus longs, c'est-à-dire possédant de 2 à 8.10^6 paires de bases ($4,6.10^6$, par exemple, chez *E. coli*) ; ceci représente en moyenne 3 à 4 000 gènes. Les plus gros génomes procaryotiques sont trouvés chez les Cyanobactéries et les Streptomycètes.

Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de séquencer, en très peu de temps, plusieurs génomes bactériens complets. La première séquence intégrale fut celle de *Haemophilus influenzae* (1995), qui comporte 1 743 gènes. On en compte actuellement près de 300 (publiés ou en voie de l'être), dont plus de 20 Archébactéries. On peut citer comme exemples : *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma sp.*, *Methanococcus sp.*, etc. On connaît désormais le nombre précis de gènes de tous ces organismes ; ces études montrent qu'une bonne partie d'entre eux correspondent à des protéines dont les fonctions sont complètement inconnues !

L'étude de l'organisation des gènes bactériens montre qu'ils sont extrêmement compactés dans le chromosome, de sorte que ce dernier ne comprend pratiquement pas de séquences « inutiles », contrairement à ce qui est décrit chez les Eucaryotes. Cette organisation remarquable est le résultat d'une longue évolution, qui s'est faite dans le cadre d'une stratégie privilégiant l'économie dans la quantité de l'information génétique. Cette observation est à rapprocher du fait que les Bactéries, êtres unicellulaires, ont un mode de reproduction asexuée avec un rythme de division très rapide (20 à 25 minutes chez *E. coli*, par exemple). Cette rapidité permet de coloniser très efficacement les milieux et d'obtenir des effectifs considérables en peu de temps. Comme des mutations apparaissent de façon régulière, elles peuvent assurer, même si elles sont peu fréquentes, une adaptation rapide des populations à tout changement de milieu, sous l'action de la sélection naturelle.

Outre leur génome spécifique, les Bactéries possèdent régulièrement, dans la nature, des **génomes** surnuméraires dits **plasmidiques** (ou **plasmides**), porteurs d'une information génétique facultative. Ces petites molécules d'ADN sont généralement double-brin, circulaires, et longues de quelques µm ; elles se perpétuent de façon autonome dans le cytoplasme des bactéries, indépendamment du chromosome principal. Les plasmides sont porteurs d'un certain nombre de gènes (en moyenne, une dizaine) qui, en s'exprimant en termes de protéines (comme n'importe quel gène bactérien, viral ou eucaryotique) grâce à la machinerie cellulaire qu'ils utilisent, confèrent à la cellule-hôte des propriétés nouvelles (voir le chapitre 15).

7.3. Génomes des organismes eucaryotiques

La première caractéristique des Eucaryotes, qui fonde leur définition originale, est que la quasi-totalité de leur matériel génétique est enfermée dans un compartiment membranaire particulier : le noyau, qui sera décrit en détail dans le chapitre 8. La réserve qui est formulée tient au fait que tous (ou presque) les Eucaryotes possèdent en outre des **génomes** dits **extranucléaires**, localisés dans certains de leurs organites : les mitochondries et les plastes.

7.3.1. Organisation et taille des génomes nucléaires

Le génome eucaryotique est typiquement fragmenté en multiples chromosomes linéaires, contenant chacun une seule molécule d'ADN. Cette particularité est certainement liée au fait que la taille moyenne des génomes eucaryotiques, exprimée en paires de bases totales, est très supérieure à celle connue chez les Procaryotes.

La *figure* 4.17 montre que la taille des génomes augmente assez régulièrement à mesure que l'on s'avance dans l'échelle de complexité évolutive des Eucaryotes. Les plus simples d'entre eux, comme la levure de bière, contiennent dans leur noyau à peine 4 fois plus d'ADN que *E. coli*, soit $1{,}6.10^{7}$ paires de bases contre $4{,}6.10^{6}$. À l'opposé de ces valeurs, on note que certains organismes contiennent dans leur génome haploïde (pour normaliser les comparaisons exprimant la complexité du génome ; on parle alors de **valeur c**) jusqu'à $1{,}3.10^{11}$ paires de bases ! On trouve ceci chez les Plantes à fleurs (Monocotylédones), certaines fougères et quelques Poissons (Dipneustes). Il existe donc quatre ordres de grandeur entre les valeurs extrêmes rencontrées chez l'ensemble des Eucaryotes ; ceci est compréhensible car la complexification des organismes nécessite un nombre de plus en plus élevé de gènes. Cet accroissement a permis tout d'abord de passer de l'état unicellulaire à l'état pluricellulaire, puis d'acquérir les différenciations multiples nécessaires pour assurer des fonctions diversifiées : locomotion, fonctions de nutrition et de relation chez les Animaux, par exemple, ainsi que la reproduction sexuée.

Cependant, si la tendance générale est à l'augmentation de la quantité d'information au cours de l'évolution, il faut noter qu'il existe des êtres vivants, relativement proches du point de vue systématique, chez qui la variabilité de la valeur c est considérable. Le fait qu'on observe une variation importante de la taille du génome au sein d'un groupe végétal ou animal (un facteur 100, dans le cas des Amphibiens, par exemple), paraît difficilement explicable : un triton ne semble pas 100 fois plus « compliqué » qu'une grenouille verte ! Un élément d'évaluation de ce paradoxe vient d'abord du calcul du nombre de gènes potentiel chez un Eucaryote complexe ; l'Homme, qui a un génome de $3{,}3.10^{9}$ paires de bases, posséderait, sur la base

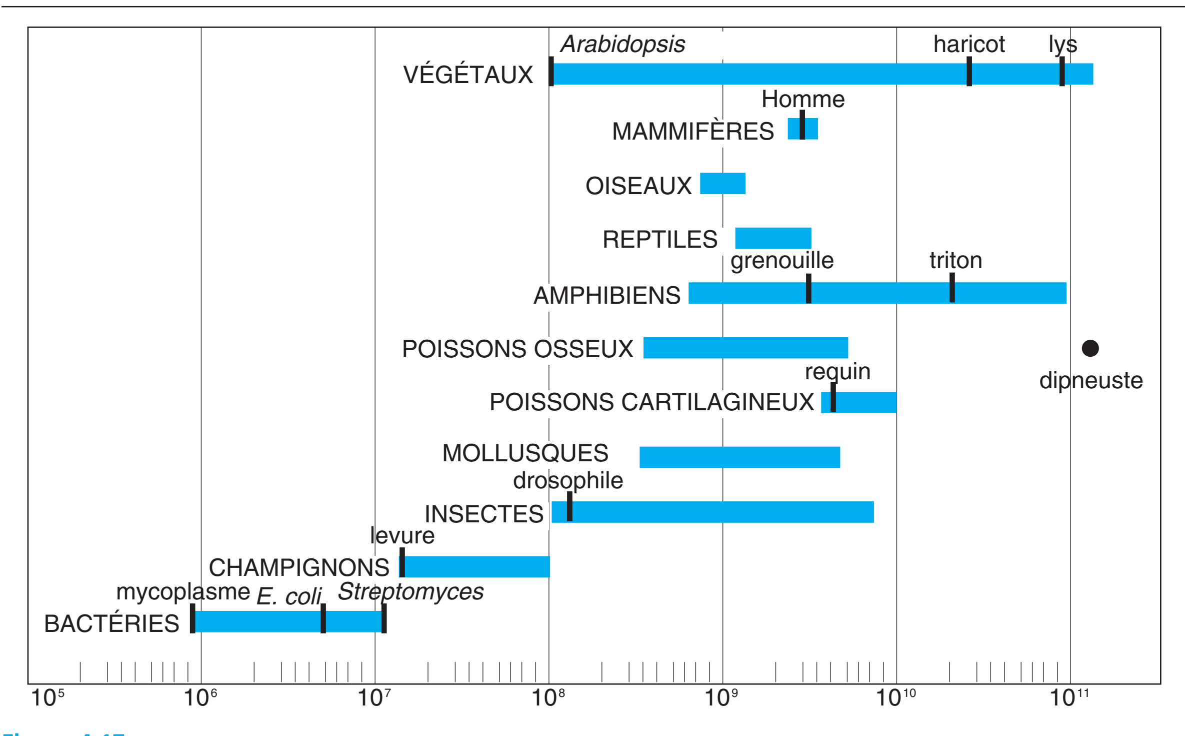


Figure 4.17

Diagramme représentant la variation des tailles des génomes des êtres vivants

Quelques exemples précis, cités dans le texte, sont mentionnés. (Échelle donnée en paires de bases)

du calcul précédemment effectué chez les Bactéries, un nombre de gènes différents de l'ordre de 10^6. Or, de nombreux arguments génétiques suggèrent que ceci ne peut pas être le cas, en raison d'un nombre trop élevé de mutations et une accumulation insupportable de gènes délétères (le fardeau génétique) ; on en déduit qu'un nombre de gènes dix fois plus faible devrait suffire.

Il existe, dans les chromosomes de la plupart des Eucaryotes, des séquences relativement courtes (de quelques dizaines à quelques centaines de bases), mais qui sont répétées le long de la molécule d'ADN à des milliers ou même des millions d'exemplaires pratiquement identiques. Cet **ADN** dit **répétitif** rend compte de la plus grande partie de l'ADN non informatif signalé plus haut. Par opposition, l'ADN informatif est largement constitué de **gènes uniques**, présents en un seul exemplaire dans un génome haploïde, et codant des protéines. Il existe aussi des gènes présents en un nombre limité de copies identiques ou très voisines (atteignant parfois quelques dizaines d'unités), et on parle alors de **familles multigéniques** : c'est le cas des histones, des tubulines, des actines… Entre ces deux situations, enfin, les gènes codant les ARNr et les ARNt sont présents en plusieurs centaines ou milliers de copies pratiquement identiques ; on parle dans ce cas de **gènes redondants**. La signification physiologique de ce phénomène a été indiquée plus haut. Les différents membres d'une famille multigénique dérivent d'un gène ancestral par duplication, puis évolution indépendante et divergente.

Pour des raisons évidentes de simplicité, le déchiffrage complet des génomes doit d'abord être conduit sur des organismes contenant un minimum d'ADN dans leurs noyaux, tout en ayant une complexité évolutive suffisante. C'est ainsi que parmi les modèles de laboratoire, on trouve respectivement chez les Animaux, les Végétaux et les Champignons : la drosophile et le Ver nommé *Caenorhabditis*, l'*Arabidopsis* (une petite Crucifère) et la levure de bière, qui ont les plus petits génomes de leur groupe (soit, dans l'ordre, environ 36, 22, 22 et 4 fois le génome de *Escherichia coli*). La relativement faible abondance d'ADN inutile dans ces génomes a permis, ou permettra, d'identifier à bref délai tous leurs gènes importants. À l'heure actuelle, plusieurs génomes sont complètement séquencés : ceux de la levure, du

Commentaire

Le paradoxe de la valeur de c

Des expériences de biologie moléculaire (hybridation de tous les ARN transcrits par des cellules variées avec l'ADN génomique) ont montré que, chez l'Homme, moins de 10 % de l'ADN est recopié en termes d'ARN et peut être qualifié d'**ADN informatif** ; de plus, nous avons vu qu'une grande partie de la séquence des ARN transcrits chez les Eucaryotes (les introns) n'est pas codante. On pense actuellement qu'un nombre de 40 000 gènes différents pour les organismes animaux ou végétaux les plus complexes est une valeur limite. L'ADN de ces génomes qui ne code ni des protéines, ni d'autres ARN non messagers, semble donc dépourvu de sens génétique ; c'est effectivement ce que démontrent les analyses les plus récentes qui permettent d'obtenir les séquences de grands fragments de chromosomes (ou de génomes complets ; voir plus loin). On peut tout à fait comparer les gènes et, mieux encore, leurs parties réellement informationnelles, à de petits îlots porteurs de sens dans un océan de séquences qui n'en ont pas ! Parmi les Eucaryotes, la levure de bière semble faire exception, car la proportion d'ADN non informatif chez cet organisme reste en effet mineure ; en particulier, la plupart de ses gènes sont dépourvus d'introns, à la manière des Procaryotes.

À partir du moment où l'on admet le principe de l'existence d'un ADN non informatif, absent chez les Procaryotes, on comprend que certains organismes puissent avoir des génomes géants, sans proportion avec le nombre réel de séquences «utiles». De même, des organismes de complexité évolutive voisine peuvent avoir accumulé plus ou moins de séquences «inutiles» dans leur génomes, sans que cela prête apparemment à conséquence. Cette observation pose des questions sur la façon dont de telles différences ont pu s'installer, et surtout sur les raisons pour lesquelles elles se maintiennent, alors qu'elles constituent une charge pour les cellules, ne serait-ce qu'énergétique, pour assurer la synthèse de tout ce matériel.

Plasmodium, du *Caenorhabditis* et de la *Drosophile*. Ils contiennent respectivement : 6 000, 5 300, 19 000 et 13 600 gènes de protéines ; près du tiers des gènes identifiés correspondent à des protéines à fonctions inconnues. Le génome de très nombreux autres organismes est en cours de séquençage : il faut mentionner divers Protistes (*Trypanosoma, Paramecium*), les Champignons des genres *Neurospora* et *Aspergillus*, et enfin la souris et l'Homme. Ce dernier projet, qui constitue un des défis de la biologie de ce début de siècle, suscite de nombreuses polémiques, à la fois scientifiques, éthiques et commerciales.

7.3.2. Les génomes des organites semi-autonomes : mitochondries et plastes

Outre leur génome nucléaire, les cellules eucaryotiques possèdent une information génétique associée aux mitochondries et aux plastes ; seuls quelques rares êtres unicellulaires ne possèdent pas de mitochondries, la plupart étant des parasites (Diplomonadines, Microsporidies et Trichomonadines). Certains auteurs considèrent, cependant, que les ancêtres de ces micro-organismes ont possédé des mitochondries (voir chapitre 15). La mise en évidence définitive des génomes extranucléaires date du début des années 60 ; des arguments génétiques, beaucoup plus anciens, avaient laissé supposer leur existence. La découverte récente de ces génomes tient au fait que, de façon assez générale, la quantité d'ADN qu'ils représentent dans les cellules reste mineure (inférieure à quelques %). Il existe néanmoins des cas particuliers où cette proportion devient non négligeable, sinon prépondérante (voir plus loin). La plupart des génomes extranucléaires sont circulaires, comme chez les Bactéries ; comme pour tous les ADN circulaires, ils existent dans un état natif surenroulé (vrillé) au sein des organites.

• L'ADN mitochondrial (ADNmt) des cellules animales mesure typiquement 5,5 µm de long environ, et est long de 16 à 17 000 paires de bases. On compte quelques centaines à quelques milliers de copies par cellule ; chaque organite en contient plusieurs exemplaires, visibles en microscopie électronique sous forme de nucléoïde, dans les coupes, ou bien individuellement après choc osmotique suivi d'étalement des molécules d'ADN. Dans l'œuf de grenouille, qui est une cellule géante (son volume est plus de 2.10^5 fois celui d'une cellule banale), mais possédant un seul noyau, le nombre de mitochondries dans le cytoplasme est tellement élevé que l'ADNmt est près de 100 fois plus abondant que l'ADN nucléaire.

Cette molécule a été complètement séquencée chez plusieurs Vertébrés et Invertébrés (Homme, xénope, bœuf, drosophile, oursin…), et on connaît exactement son organisation et son contenu informatif, qui ont été très conservés au cours de l'évolution (voir *figure* 4.18). L'organite possède sa propre machinerie de réplication, de fabrication d'ARN et de synthèse de protéines, mais nous verrons cependant que cela ne suffit pas pour lui conférer une véritable autonomie (voir chapitres 9 et 10). L'ADNmt animal possède deux caractéristiques très originales : 1) il est extrêmement compact au plan génétique, dans la mesure où aucune séquence intergénique et aucun intron n'existent, et 2) le code génétique utilisé diffère du code universel au niveau de trois codons : le codon stop UGA, par exemple, code ici le tryptophane.

• L'ADNmt des Champignons varie de 19 à 108.10^3 paires de bases, selon les genres. Il a sensiblement la même capacité de codage que celui des cellules animales, mais il est en général beaucoup plus « éclaté » ; le plus connu est celui de la levure de bière, qui comprend 78.10^3 paires de bases et mesure 25 µm de long. Le code génétique diverge ici aussi du code universel, au niveau de trois codons (dont un différent de celui des Animaux).

• L'ADNmt des Végétaux (0,2 à $2,4.10^6$ paires de bases) est beaucoup plus grand et complexe que celui décrit chez les Animaux, et donc bien moins connu. Il manifeste une très grande diversité, même entre espèces apparentées. Au sein d'une seule cellule, et probablement au sein d'une même mitochondrie, la taille des molécules est très variable : on y trouve des molécules circulaires pouvant atteindre plusieurs centaines de µm de long, parmi lesquelles on distingue des « molécules maîtres » et des « molécules filles » plus courtes (donc incomplètes), de taille et structure très diverses, qui en dérivent par des processus de recombinaison interne complexes. Pour cette raison, le contenu informationnel de l'ADN de ces mitochondries est longtemps resté difficile à identifier ; mis à part le génome d'une Hépatique : *Marchantia* ($1,86.10^5$ paires de bases ; 94 gènes), seules des séquences partielles du génome sont disponibles. Le code génétique est ici le code universel. L'ADNmt d'une Algue rouge : *Chondrus*, est également séquencé ($25,8.10^3$ paires de bases ; 51 gènes, dont 3 ARNr) ; curieusement, il est assez

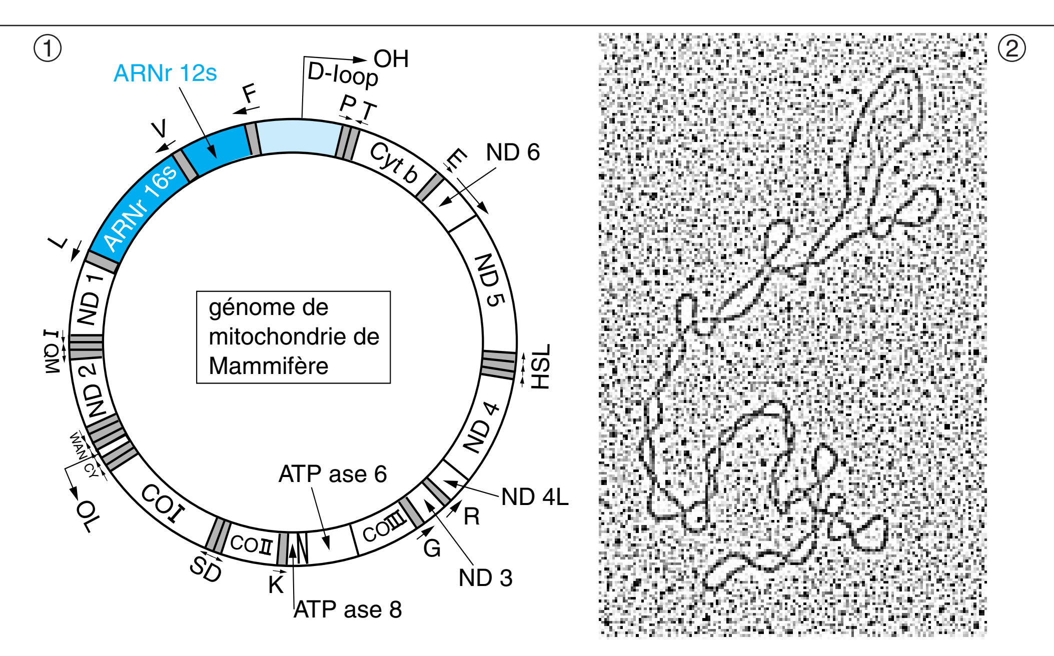


Figure 4.18

Molécules d'ADN mitochondrial des Animaux

(1) Carte de l'ADNmt des Mammifères. Noter l'organisation très compacte de ce génome, dans lequel aucune séquence intergénique n'existe, en dehors de l'origine de réplication (*D-loop*, en rouge pâle), non exprimée. Ce génome possède 2 gènes d'ARNr (12 et 16 S), 22 gènes d'ARNt (en gris) et 13 gènes codant des chaînes polypeptidiques, appartenant toutes à des complexes de la membrane mitochondriale interne (transporteurs d'électrons et ATP synthétase ; voir chapitre 10). **(2)** photo d'une molécule d'ADNmt de xénope, vrillée et ayant entamé sa réplication. (Cliché Labo BG, Orsay). Voir aussi le cliché 10.5c, pour l'ADNmt observé *in situ*.
CO : cytochrome oxydase ; ND : NADH déshydrogénase. Les ARNt sont désignés par les acides aminés fixés, dans la nomenclature à une lettre.

semblable à celui des Animaux par sa taille, son caractère très compact et le fait qu'il utilise un code génétique modifié.

• L'ADN chloroplastique des Végétaux verts (125-200.10^3 paires de bases) a une taille relativement importante : 45 à 60 µm de long. En raison de celle-ci et du nombre élevé de copies par organite (plusieurs dizaines), cet ADN est souvent assez abondant dans les cellules végétales : > 10 %. Contrairement à l'ADN mitochondrial végétal, sa longueur et son organisation dans une espèce donnée sont bien déterminées. Cette caractéristique, ajoutée au fait que les chloroplastes sont faciles à isoler et à purifier, a permis d'obtenir la séquence complète de cette molécule chez plusieurs organismes (*Marchantia*, le tabac, le maïs, le riz, etc.). Ce génome est très conservé évolutivement ; il possède plus de 100 gènes, impliqués dans la biogenèse de l'organite, dont 60 environ codent des protéines. Comme dans le cas de l'ADN mitochondrial, on trouve parmi les gènes identifiés ceux participant à la constitution de l'appareil interne de traduction : ARNr et ARNt (ainsi que quelques protéines ribosomales), et ceux intervenant dans la fabrication d'enzymes endogènes. Parmi les protéines connues, il faut signaler que la plus grosse des deux sous-unités de l'enzyme nommée RUBISCO est codée par l'ADN de l'organite lui-même (voir chapitre 10).

Le génome plastidial des Algues est en cours d'étude ; aucun d'eux n'est encore entièrement séquencé, mais de nombreux gènes sont déjà connus. Des renseignements très importants sont attendus de ce travail, en particulier pour ce qui concerne l'origine évolutive sans doute hétérogène des plastes dans ce groupe, dans le cadre de la théorie endosymbiotique (voir chapitre 16).

Dans tous les cas, le nombre de protéines codées par ces génomes reste très faible par rapport à toutes celles qui constituent les organites (300 à 400 chez les mitochondries animales, et probablement plus dans les chloroplastes). En général,

moins de 5 % sont codées et fabriquées sur place, toutes les autres étant codées par des gènes nucléaires et fabriquées dans le hyaloplasme, sur des ribosomes libres, puis importées (voir chapitre 9) ; l'expression consacrée : organites semi-autonomes, semble donc très exagérée.

Les mitochondries ou les plastes contiennent un grand nombre de compartiments tels que : membranes externe et interne, espace intermembranaire, sacs thylakoïdiens, matrice ou stroma ; des mécanismes précis d'adressage et d'importation doivent permettre aux chaînes polypeptidiques d'origine exogène d'entrer dans les organites et d'y trouver exactement leur place. De façon générale, la biogenèse de ces organites pose des problèmes importants de coordination entre l'expression des deux types de génomes, car les protéines d'origine exogène et endogène s'associent pour former des complexes mixtes plurienzymatiques de grande taille.

RÉSUMÉ

Le matériel génétique de tous les êtres vivants est constitué d'ADN ; l'expression finale du message contenu dans ce dernier est traduite en termes de protéines, grâce à des mécanismes qui s'avèrent aussi universels. Une catégorie de molécules intermédiaires, les ARN, est toujours mise en œuvre, mais les modalités de leur intervention dans la synthèse des chaînes polypeptidiques sont très diverses. Les phénomènes fondamentaux de synthèse des ARN (transcription), et de synthèse des protéines (traduction), sont basés sur le principe simple de la colinéarité, selon lequel une correspondance point par point existe entre toutes les molécules linéaires qui sont mises en jeu.

Le recopiage des longues molécules d'ADN en ARN nécessite, outre les précurseurs de ce dernier, une enzyme capable de reconnaître le brin d'ADN à transcrire ainsi que des signaux indiquant le point de départ et le point d'arrêt du processus, le long de ce dernier. Trois catégories principales d'ARN sont produites : les ARNr, qui entrent dans la constitution des ribosomes, les ARNm, qui spécifient directement les protéines, et les ARNt, qui servent d'adaptateurs pour aligner les acides aminés dans l'ordre des codons portés par l'ARNm.

La machinerie de synthèse des protéines est constituée par les ribosomes qui, avec l'aide des ARNt, fonctionnent comme une surface active permettant à la fois le décryptage du message contenu dans les ARNm et l'allongement de la chaîne polypeptidique.

Les gènes de protéines présentent une organisation très différente chez les Procaryotes et les Eucaryotes ; chez les premiers, ils sont organisés en opérons fournissant des ARNm polygéniques, et permettant de fabriquer plusieurs protéines distinctes ; chez les seconds, ces gènes ont une organisation complexe, discontinue, mais qui conduit à produire un ARNm monogénique.

La régulation de l'expression des gènes chez les Procaryotes relève essentiellement de mécanismes mettant en jeu des répresseurs protéiques (contrôle négatif), agissant dans le cadre de systèmes inductibles ou répressibles.

La synthèse des protéines nécessite des enzymes, une machinerie et des étapes qui sont très voisines chez tous les êtres vivants. La première d'entre elles est l'étape capitale de charge des ARNt par leurs acides aminés spécifiques, grâce aux aminoacyl-ARNt synthétases. La phase de démarrage conduit ensuite à la reconnaissance du premier codon AUG, ce qui permet le positionnement correct du ribosome sur la bonne phase de lecture. L'élongation de la chaîne polypeptidique implique le déplacement relatif du ribosome le long de l'ARNm, codon après codon, et se termine au niveau des codons stop, avec l'intervention de facteurs protéiques spécifiques.

En raison de profondes différences dans leur organisation, il existe des caractéristiques propres aux Procaryotes et aux Eucaryotes, en ce qui concerne les aspects cellulaires de la traduction.

Perspective biomédicale

Résistance des bactéries aux antibiotiques et santé publique

Depuis près de dix ans, les média se font l'écho de la prolifération des souches bactériennes insensibles à tous les antibiotiques. Des problèmes cliniques préoccupants sont d'abord apparus dans les hôpitaux (infections nosocomiales), mais les phénomènes de multirésistance concernent aujourd'hui la médecine de ville (infections communautaires). L'ampleur du phénomène ne fait aucun doute, et il semblerait que le combat mené par l'Homme contre les maladies infectieuses, depuis soixante ans, soit en train d'être perdu. Quelques années suffisent, après la mise au point d'un nouvel antibiotique, pour que des bactéries sensibles développent des mécanismes de résistance.

Il s'agit en fait d'un phénomène inéluctable et très naturel d'adaptation à un milieu hostile, ne représentant qu'un aspect particulier d'une évolution commencée il y a plus de 3 milliards d'années. Cette rapidité étonnante de réaction est d'abord liée au fait que les bactéries se multiplient très rapidement, constituant des populations considérables, au sein desquelles la sélection naturelle fait émerger les individus mutants favorisés (même apparus avec des probabilités infimes).

Deux facteurs aggravants, dont l'identification par les chercheurs est assez récente, expliquent cette rapidité : 1) les bactéries disposent d'un large éventail de défenses contre les antibiotiques, telles que : leur inactivation par une modification enzymatique simple, leur rejet hors du cytoplasme par des transporteurs qui maintiennent leur concentration en dessous du seuil de toxicité, la modification de leur cible, qui devient insensible à leur action, 2) les gènes de résistance aux antibiotiques existent déjà dans la nature et sont présents chez des souches bactériennes naturellement résistantes, en particulier celles qui produisent ces molécules (les antibiotiques sont des substances naturelles, à rôle défensif, sélectionnées par les microbiologistes et perfectionnées par les biochimistes). Le passage de ces gènes, d'une souche (ou même d'une espèce) résistante à une autre sensible, est relativement aisé grâce à des transferts génétiques dits horizontaux ; ceux-ci mettent en œuvre des plasmides et des processus de transposition. Des plasmides déterminant la résistance simultanée à six familles d'antibiotiques ont ainsi été mis en évidence ; l'acquisition d'une telle molécule par une cellule sensible lui confère la multirésistance en une seule étape !

Les agents responsables des maladies nosocomiales sont très souvent des bactéries commensales de la peau et des muqueuses, peu pathogènes, mais lorsque celles-ci infectent des sujets affaiblis ou immunodéprimés, elles deviennent dangereuses (septicémies, pneumopathies). C'est le cas des staphylocoques dorés ou des entérobactéries, dont certaines souches ne sont plus vaincues que par des doses élevées de vancomycine. Les infections communautaires sont en général dues à des pneumocoques (otites, méningites), des gonocoques (infections génitales), des salmonelles ou des *haemophilus* ; elles échappent de plus en plus aux antibiothérapies classiques (pénicillines, érythro mycines).

Outre ces raisons biologiques, l'extension rapide des multirésistances s'explique par divers facteurs sociaux tels que : mondialisation des échanges humains et commerciaux, vieillissement des populations des pays développés, pandémies (le sida), et enfin la banalisation des traitements aux antibiotiques, accompagnés de pratiques abusives considérées, a posteriori malheureusement, comme négatives et favorisant les multirésistances.

Afin de préserver l'efficacité d'un outil thérapeutique irremplaçable, diverses structures de surveillance et de coordination à l'échelle internationale ont été mises sur pied dès les années 70, mais des mesures urgentes s'imposent : diminution de la consommation des antibiotiques et rationalisation de leur utilisation en médecine de ville, recherche de nouvelles molécules actives (aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'a été découverte depuis trente ans !), et enfin diminution de leur usage courant comme additif alimentaire dans l'élevage animal.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Rappeler les principales étapes de l'expérience historique de «transformation bactérienne» et les expériences ultérieures ayant permis d'identifier la nature chimique du «principe transformant».
2. Citer les arguments et les preuves qui démontrent que l'ADN constitue le matériel génétique des Eucaryotes.
3. Quel est l'intérêt d'un organisme tel que *Neurospora* pour l'étude du fonctionnement du matériel génétique ?
4. Qu'appelle-t-on colinéarité gène protéine ? Citer un exemple classique de cette observation capitale.
5. Combien existe-t-il de codons dans le code génétique universel ? Spécifient-ils tous des acides aminés, et comment explique-t-on le fait que certains acides aminés soient spécifiés par plusieurs codons ?
6. Quels arguments et expériences ont permis de conclure à la nécessité de l'intervention des ARN dans le fonctionnement des gènes ?
7. Décrire les éléments de base de la machinerie de transcription, ainsi que son mécanisme.
8. Qu'appelle-t-on unité de transcription ?
9. Le long d'une molécule d'ADN, est-ce toujours le même brin qui est transcrit, c'est-à-dire parcouru par l'ARN polymérase ?
10. Combien y a-t-il d'ARNr dans un ribosome procaryotique, dans un ribosome eucaryotique (hyaloplasmique) ? Citer leurs coefficients de sédimentation.
11. Quelles sont les principales caractéristiques structurales et fonctionnelles des ARNt ?
12. Quelles sont les proportions des trois principales catégories d'ARN dans toutes les cellules ?
13. Décrire les différences majeures qui existent entre les gènes de protéines des Eucaryotes et des Procaryotes.
14. Décrire les signaux de démarrage de la transcription fonctionnant chez les Procaryotes ; quel est l'intérêt de l'organisation des gènes en opérons ?
15. Quelles ressemblances et différences existe-t-il entre des opérons inductibles et répressibles, chez les Bactéries ?
16. Décrire les principales étapes de la synthèse d'une chaîne polypeptidique.
17. Nommer 4 antibiotiques interférant avec la synthèse des protéines bactérienne et préciser quel est leur mode d'action.
18. Quel est le codon de démarrage de toutes les protéines, chez tous les êtres vivants, et quel acide aminé code-t-il ?
19. Quelles sont les caractéristiques spécifiques de la traduction chez les Procaryotes et les Eucaryotes ?
20. Pourquoi le phénomène de «transcription/traduction simultanées» mis en évidence chez les Bactéries est-il impossible à observer chez les Eucaryotes ?
21. En quoi les génomes des Virus sont-ils particulièrement originaux ?
22. Quelle est l'étendue des tailles des génomes procaryotiques ? comment sont-ils organisés ?
23. Pourquoi certains génomes eucaryotiques sont-ils de taille gigantesque, et sans aucun rapport avec un réel contenu en ADN informatif ?
24. Quelle est la caractéristique majeure de l'ADN mitochondrial des Animaux ? en quoi est-il différent de celui des Végétaux ?



Chapitre 5

ORGANISATION GÉNÉRALE ET FONCTIONS DES MEMBRANES BIOLOGIQUES

Le chapitre 3 a démontré le caractère omniprésent des membranes dans les cellules procaryotiques ou eucaryotiques, toute cellule étant au minimum limitée par une membrane cytoplasmique. On peut cependant trouver des structures membranaires typiques autour d'entités non cellulaires, comme certains Virus, mais ceci tient à leur mode de multiplication qui se fait par bourgeonnement à travers la membrane limitante de la cellule-hôte (voir chapitre 15).

Le rôle fondamental des membranes est d'assurer une **compartimentation** métabolique et chimique en permettant le maintien de compositions et de concentrations différentes dans les espaces qu'elles délimitent. Cependant, celles-ci ne peuvent constituer des barrières absolues car la vie des cellules et le fonctionnement de leurs organites nécessitent des échanges continuels et contrôlés de matière, d'énergie et d'information. Ces deux propriétés, qui semblent antinomiques, sont en fait dues à l'assemblage des deux types de constituants majeurs de toutes les membranes biologiques : les lipides et les protéines.

La connaissance de la composition chimique globale des membranes est ancienne tandis que celle de son architecture détaillée et du fonctionnement des diverses familles de protéines qui les constituent est relativement récente. La mise au point des techniques de fractionnement cellulaire, le renouvellement des approches cytologiques permettant de visualiser des surfaces, et la puissance de méthodes analytiques telles que l'électrophorèse ont permis, en quelques dizaines d'années, de se faire une idée très précise de l'organisation fonctionnelle des membranes (voir chapitre 3).

Deux propriétés essentielles caractérisent les membranes : l'**asymétrie**, c'est-à-dire le fait que leurs deux faces ne sont jamais identiques (c'est vrai pour toutes les membranes connues), d'une part, et la **fluidité**, liée à une organisation relativement lâche, non covalente, des différents composants membranaires, d'autre part. Cette dernière autorise une grande mobilité moléculaire, condition *sine qua non* d'un nombre important de fonctions. La question de la **perméabilité** membranaire et des échanges sera traitée dans le chapitre 6. La diversité des membranes, brièvement présentée dans la dernière partie de ce chapitre, sera décrite dans le détail lors de l'analyse des multiples activités cellulaires et des organites qui y sont associés.

Une première façon de mesurer l'importance des fonctions membranaires consiste à examiner, par exemple, les surfaces représentées par les différents organites au sein de quelques types de cellules eucaryotiques (voir *tableau* 5.1).

Type de membrane	Cellule pancréatique	Cellule hépatique
• membrane plasmique	5	2
• enveloppe nucléaire	1,4	0,5
• réticulum endoplasmique :		
– lisse	< 1	16
– rugueux	60	35
• appareil de Golgi	10	7
• mitochondries :		
– membrane externe	4	7
– membrane interne	17	32
• vésicules de sécrétion	3	–
• lysosomes et peroxysomes	–	1

Tableau 5.1

Pourcentages comparés des surfaces membranaires dans deux types de cellules animales différenciées

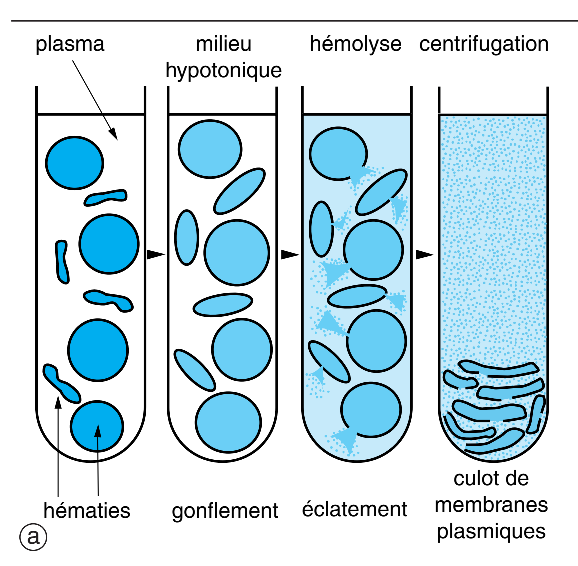
La taille de la cellule pancréatique exocrine est de 12-13 µm, soit un volume voisin de 1 000 μm^3, tandis que celle de l'hépatocyte est de 20-22 µm, soit un volume voisin de 5000 μm^3. Les différences considérables en ce qui concerne les surfaces des réticulum lisse et rugueux traduisent des activités physiologiques très différentes (modifié d'après Alberts *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion).

1. COMPOSITION CHIMIQUE DES MEMBRANES

1.1. Premières données expérimentales

Dès le début du siècle, à la suite de travaux sur la perméabilité cellulaire vis-à-vis de diverses substances organiques, plusieurs auteurs ont proposé que la membrane plasmique soit essentiellement constituée de lipides. Ils avaient en effet observé une relation étroite entre le caractère liposoluble d'un composé et sa capacité à pénétrer dans les cellules. Certaines substances, telles que les cétones ou les éthers (qui sont des solvants des lipides), ou d'autres qui sont elles-mêmes solubles dans ces solvants, s'accumulent beaucoup plus rapidement dans le cytoplasme que celles plus solubles dans l'eau. Ce résultat semblait paradoxal dans la mesure où les cellules présentent surtout des besoins nutritifs en composés hydrosolubles tels que les sucres ou les acides aminés. De fait, certaines exceptions (le méthanol ou l'éthylène-glycol, par exemple), conduisaient à penser que la membrane n'était pas homogène sur toute sa surface et qu'elle devait pouvoir laisser passer de tels composés, peu liposolubles. Ces expériences seront détaillées dans le chapitre 6.

En 1926, un autre type de résultats était obtenu par une approche chimique directe sur une catégorie de cellules qui s'avère être, depuis lors, un « système-modèle » pour l'étude des membranes : les hématies de Mammifères. Ces cellules, non nucléées, sont également dépourvues de tout système membranaire interne et la membrane cytoplasmique entoure un hyaloplasme essentiellement constitué d'hémoglobine. L'**hémolyse** de ces cellules (voir *figure* 5.1) permet de les vider de leur contenu et de purifier aisément, après centrifugation, leur seule membrane limitante ; on obtient alors ce qu'on appelle des **fantômes d'hématies**. L'analyse chimique de ces structures a montré qu'elles contenaient une proportion importante de lipides (40 % de la masse), associés à des protéines et des glucides. Des expériences élégantes, utilisant la propriété propre aux lipides de constituer des monocouches moléculaires à la surface de l'eau, ont conduit à suggérer que la membrane était constituée d'une double couche lipidique. En effet, la surface de la monocouche, obtenue à partir de la totalité des lipides membranaires purifiés provenant d'une quantité connue d'hématies, correspondait à peu près au double de la surface de leurs membranes cytoplasmiques !



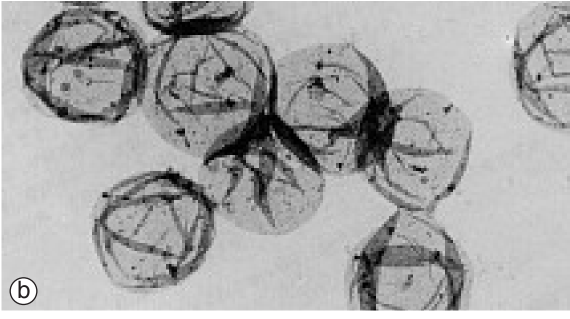


Figure 5.1

(1a) Protocole permettant de réaliser l'hémolyse (= lyse osmotique) des hématies de Mammifères et d'obtenir des structures appelées fantômes, réduites à la simple membrane cytoplasmique de ces cellules ; il semble que la cellule ne s'ouvre qu'en un seul point de sa membrane, **(1b)** Cliché montrant des fantômes d'hématies en microscopie électronique ; × 2000 (Labo. B.G., Orsay).

D'autres arguments, tels qu'une forte résistance électrique (mesurée sur des axones géants de calmar), ou une grande sensibilité des membranes vis-à-vis des **agents lipolytiques** : solvants, détergents, certaines enzymes (phospholipases), renforçaient l'idée qu'une composante lipidique jouait un rôle majeur dans l'organisation membranaire.

1.2. Différents types de lipides membranaires

On distingue trois catégories principales de lipides membranaires : les **phospholipides**, les **glycolipides** et les **stérols** ; ces derniers ne répondent pas exactement à la définition classique des lipides mais sont des molécules apparentées au plan physicochimique.

1.2.1. Phospholipides

Ce sont des molécules complexes contenant, outre C, H et O, du phosphore et éventuellement de l'azote. L'alcool, qui est lié à un ou deux acides gras, est soit le glycérol, soit un alcool aminé à chaîne grasse : la sphingosine. On parle donc, selon le cas, de **glycérophospholipide** ou de **sphingophospholipide**.

La structure de base des premiers est la suivante :
- une molécule de glycérol : $CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CH_2OH$;
- deux molécules d'acide gras, saturés ($CH_3\text{-}(CH_2)n\text{-}COOH$) ou insaturés ;
- une molécule d'acide phosphorique : H_3PO_4 ;
- une molécule supplémentaire liée à l'acide phosphorique.

C'est cette dernière molécule qui confère son identité au lipide en question. Les trois fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par deux acides gras et l'acide phosphorique, constituant ainsi l'**acide phosphatidique**. La molécule supplémentaire peut être un alcool (le glycérol, l'inositol, la choline, l'éthanolamine) ou un acide aminé (la sérine) ; ces trois derniers composés contiennent de l'azote. La molécule finale porte, suivant les cas, le nom de phosphatidyl-glycérol, phosphatidyl-inositol… (voir *figure* 5.2). La phosphatidylcholine, trouvée en abondance dans le jaune d'œuf, est la plus connue et porte aussi le nom de **lécithine** ; le diphosphatidyl-glycérol (ou **cardiolipide**), caractéristique de la membrane interne des mitochondries et de la membrane plasmique des Procaryotes est aussi une de ces molécules. On notera que la molécule supplémentaire apporte, ou pas, selon sa nature, une ou deux charges électriques au phospholipide (en plus de celle liée à l'acide phosphorique). La principale caractéristique physicochimique de tous ces phospholipides est l'**amphiphilie**, qui sera définie plus loin.

La composition de base des sphingophospholipides est très différente de celle des molécules précédentes mais la structure finale obtenue s'en rapproche étonnamment ; elle comprend :
- une molécule de sphingosine (alcool aminé à longue chaîne grasse) ;
- une molécule d'acide gras ;
- une molécule d'acide phosphorique ;
- une molécule supplémentaire (de même nature que celles vues plus haut et liée de la même façon à l'acide phosphorique).

CH_3 ∧∧∧∧∧∧∧ $CO-O-CH_2$

CH_3 ∧∧∧∧∧∧∧ $CO-O-CH$

Acide phosphatidique

$CH_2-O-P(=O)(O^-)-O-H$ (ou $-O-$ X)

X =

$-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$: phosphatidylcholine

$-CH_2-CH_2-NH_3^+$: phosphatidyléthanolamine

$-CH_2-CH(COO^-)-NH_3^+$: phosphatidylsérine

$-CH_2-CHOH-CH_2OH$: phosphatidylglycérol

(cycle inositol : HO, H, OH, H, OH, H, OH, H, H, OH, H) : phosphatidylinositol

Figure 5.2

Formules de quelques glycérophospholipides (diacylphosphoglycérides)

L'acide phosphatidique constitue la partie commune à toutes ces molécules, tandis que la molécule supplémentaire X permet de les distinguer les unes des autres. Les chaînes d'acides gras sont schématisées sous la forme d'un zig-zag.

Sphingosine $CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-CH(OH)-CH(NH_3^+)-CH_2OH$

Céramide $CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-CH(OH)-CH-CH_2OH$
CH_3 ∧∧∧∧∧∧∧ $CO-NH$

Sphingophospholipide $CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-CH(OH)-CH-CH_2-O-P(=O)(O^-)-O-X$
CH_3 ∧∧∧∧∧∧∧ $CO-NH$

Figure 5.3

Formules de la sphingosine, de la céramide et d'un sphingophospholipide

Si X est constitué de choline, on obtient la sphingomyéline.

La liaison amide de l'acide gras sur la fonction NH_2 de la sphingosine donne la **céramide** (voir *figure* 5.3). L'encombrement et les propriétés physicochimiques de ces molécules sont identiques à ceux des glycérophospholipides vus plus haut. La **sphingomyéline**, qui contient de la choline, est un représentant typique de cette catégorie ; on la trouve en abondance dans le système nerveux.

1.2.2. Glycolipides

Leur organisation rappelle celle des lipides précédents, à la différence près qu'ils ne possèdent pas d'acide phosphorique ; ils sont construits à partir de glycérol (**glycéroglycolipides**) ou de sphingosine (**sphingoglycolipides**), mais la troisième fonction alcool du premier ou la fonction alcool terminale du second sont directement estérifiées par un sucre ou un dérivé de sucre qui constituent le groupement polaire « de tête » (voir *figure* 5.4). L'identité de ces molécules est conférée par cette partie glucidique qui varie en fonction de la nature et du nombre des motifs osidiques ; les plus simples contiennent un seul ose. On distingue les glycolipides neutres (porteurs d'oses seuls : glucose ou galactose) et ceux qui sont électriquement chargés (porteurs en particulier d'**acide sialique** ou acide N-acétylneuraminique).

Chez les Bactéries ou les Végétaux, on ne trouve que des glycolipides neutres à glycérol, tandis que ceux à sphingosine sont très abondants chez les Animaux, en particulier dans les cellules nerveuses. Parmi ceux-ci, on doit citer le **galactocérébroside** (neutre), contenant du galactose seul et trouvé presque exclusivement dans la gaine de myéline entourant les axones des Vertébrés (cette gaine est formée par des couches concentriques de membrane plasmique de cellules spécialisées entrant en contact avec l'axone), et les **gangliosides** (chargés), qui portent des chaînes plus ou moins ramifiées riches en acide sialique ; ces derniers sont abondants dans la membrane plasmique des cellules du système nerveux, où l'on en a identifié plusieurs dizaines d'espèces différentes.

1.2.3. Cholestérol

Ce composé est typique des cellules animales ; totalement absent des membranes bactériennes et des membranes végétales, il est cependant remplacé chez ces dernières par des stérols de nature différente. Sa formule montre un volumineux noyau hydrophobe constitué de quatre cycles

1) Diacylglycoglycéride

2) Sphingoglycolipide

3) Acide sialique

Figure 5.4

Formules de deux glycolipides et de l'acide sialique

(1) Glycéroglycolipide (diacylglycoglycéride) à galactose : galactolipide.

(2) Sphingoglycolipide à galactose : galactocérébroside.

(3) Acide sialique (acide N-acétyl neuraminique, ou NANA) que l'on rencontre dans tous les gangliosides.

(hydrocarbure tétracyclique) portant une chaîne carbonée latérale ramifiée de huit carbones, elle-même hydrophobe. À l'opposé de cette chaîne, on trouve un groupement alcool (le seul motif hydrophile de la molécule). L'ensemble forme une sorte d'ellipsoïde aplati et rigide présentant un caractère bipolaire amphiphile, typique des lipides (voir *figure* 5.5). L'analyse de sa formule montre que le cholestérol n'est pas un lipide « normal » (un ester) ; on le classe cependant parmi les lipides membranaires car, pour des raisons physicochimiques, il joue le même rôle qu'eux au sein des membranes plasmique ou internes, où il est parfois très abondant (voir le *tableau* 5.2).

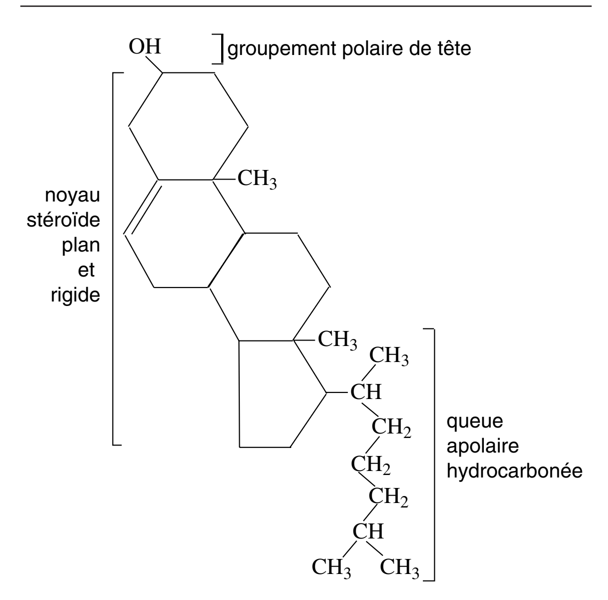


Figure 5.5

Formule du cholestérol

Noter l'importance considérable de la partie hydrophobe de cette molécule (noyau stéroïde et queue hydrocarbonée ramifiée), en comparaison de la seule fonction polaire (-OH) qu'elle porte à l'opposé de la chaîne hydrocarbonée.

1.3. Diversité et spécialisation des protéines membranaires

Bien que les lipides membranaires présentent une certaine variété, comme on vient de le voir, la diversité des membranes cellulaires et la spécificité de leurs fonctions, au moins chez les Eucaryotes, sont essentiellement liées à celles des protéines qui y sont associées. Elles y jouent des rôles de **récepteurs** et de **transporteurs** (de matière ou d'information), des rôles de reconnaissance et d'adhérence entre cellules, d'accrochage aux cellules voisines ou à la matrice extracellulaire, de capture d'énergie physique (la lumière), ou tout simplement de catalyse enzymatique… Un pre-

	Membrane plasmique d'érythrocyte	Membrane myélinique	Membrane de microsome	Membrane interne de mitochondrie	Membrane plasmique de *E. coli*
Protéines	50	18	62	76	–
Lipides totaux	42	79	32	24	–
Glucides	8	3	6	0	–
Phospholipides :					
– Ph. éthanol-amine	20	15	17	30	80
– Ph. sérine	10	9	6	2	0
– Ph. choline	22	12	50	42	0
– Ph. inositol	2	0	10	8	0
– Ph. glycérol	0	0	2	2	15
– di-ph. glycérol	0	0	0	14	5
– sphingomyéline	18	8	8	0	0
Glycolipides :	3	28	0	0	0
Cholestérol :	25	26	6	2	0

Tableau 5.2

Comparaison des compositions chimiques globales de différents types de membranes rencontrées chez les Procaryotes et dans divers organites de cellules eucaryotiques

Les pourcentages moyens des différents types de lipides sont également donnés ; les glucides existent sous la forme de glycoprotéines et de glycolipides. Suivant les types de membranes, on compte de 10 à 100 molécules de lipides pour une molécule de protéine.

mier aperçu de ces fonctions sera examiné, à travers quelques exemples, à la fin de ce chapitre.

1.4. Composants glucidiques des membranes

L'analyse chimique de très nombreuses membranes cellulaires montre la présence constante, bien qu'en quantité très variable, de molécules de nature glucidique. En fait, celles-ci n'existent pas à l'état libre mais sont toujours associées, de façon covalente, aux autres molécules constitutives de la membrane. Nous avons déjà vu que des glycolipides peuvent être trouvés dans les membranes, mais leur contribution à cet égard reste faible ; la plus grande partie de la masse des glucides membranaires est liée aux protéines. Nous verrons plus loin que les motifs glucidiques associés à ces dernières sont souvent très nombreux et parfois de très grande taille. Les **protéines** de ce type sont dites **glycosylées** et se répartissent, en fonction de la masse relative de ces motifs, en **glycoprotéines** ou en **protéoglycanes** (chez ces dernières, la masse des sucres ou dérivés peut dépasser 90 % de leur masse totale).

Une particularité, qui sera analysée en détail lors de l'étude de la membrane cytoplasmique (voir chapitre 6), est que tous les motifs glucidiques liés aux lipides ou aux protéines sont tournés d'un même côté de la membrane, contribuant à une forte asymétrie de sa structure. Dans le cas de la membrane cytoplasmique, tous ces résidus sont tournés vers l'extérieur de la cellule, tandis que pour le réseau interne, ils sont tournés vers la lumière de celui-ci ; autrement dit, les glucides sont toujours tournés vers la face non hyaloplasmique des membranes. La raison de cette observation sera donnée lors de l'étude de la biogenèse de la plupart des membranes cellulaires, qui ont une origine unique (voir chapitre 9).

1.5. Diversité de la composition chimique globale des membranes

Indépendamment de la nature précise des protéines qui les constituent, les membranes peuvent d'abord être caractérisées par leurs proportions globales en lipides et en protéines. Comme le montre le *tableau* 5.2, celles-ci sont très variables d'une membrane à une autre, au sein d'une même cellule eucaryotique ; dans le détail, également, on notera que les proportions des différents lipides sont spécifiques. Il existe de plus une grande différence à cet égard entre les Procaryotes et les Eucaryotes et, de façon générale, les premiers présentant une moins grande diversité en lipides que les seconds.

On remarquera enfin qu'il existe une certaine ressemblance entre la composition en lipides des organites semi-autonomes (mitochondries et plastes) et celle de la membrane plasmique des Procaryotes ; cette parenté chimique tient probablement à l'origine évolutive de ces organites qui sera discutée dans le chapitre 15 (**théorie endosymbiotique**). Chez les Eucaryotes, la diversité en lipides des membranes correspond, pour partie, à une adaptation fonctionnelle (imperméabilité à divers composants, fluidité…), mais elle reste encore globalement mal comprise ; ceci est particulièrement vrai pour les glycolipides.

2. ORGANISATION MOLÉCULAIRE DES MEMBRANES

2.1. Structures d'autoassemblage des lipides membranaires

Tous les lipides décrits précédemment ont en commun la propriété remarquable d'être bipolaires et **amphiphiles** : une partie de la molécule (la plus importante en volume) est très **hydrophobe**, en raison de la présence des chaînes d'acides gras ou des cycles d'hydrocarbure (cas du cholestérol), tandis que l'autre pôle est **hydrophile**, en raison de la présence de l'acide phosphorique et/ou des motifs glucidiques riches en groupements polaires, des fonctions amines ou des fonctions acides des molécules associées (choline, sérine, acide sialique…). Toutes ces molécules peuvent être représentées par une « tête » hydrophile munie d'une queue hydrophobe, généralement constituée de deux « jambes » hydrocarbonées. Il est connu, depuis longtemps, que de telles molécules, mises en présence d'eau, se disposent de façon très précise et régulière, en raison des propriétés physicochimiques mixtes qu'on vient de décrire. Trois types de structures s'assemblant spontanément (dites d'**autoassemblage**, voir chapitre 1), qui sont obtenus à partir de mélanges de phospholipides purifiés et d'eau, peuvent être schématiquement décrits (voir *figure* 5.6).

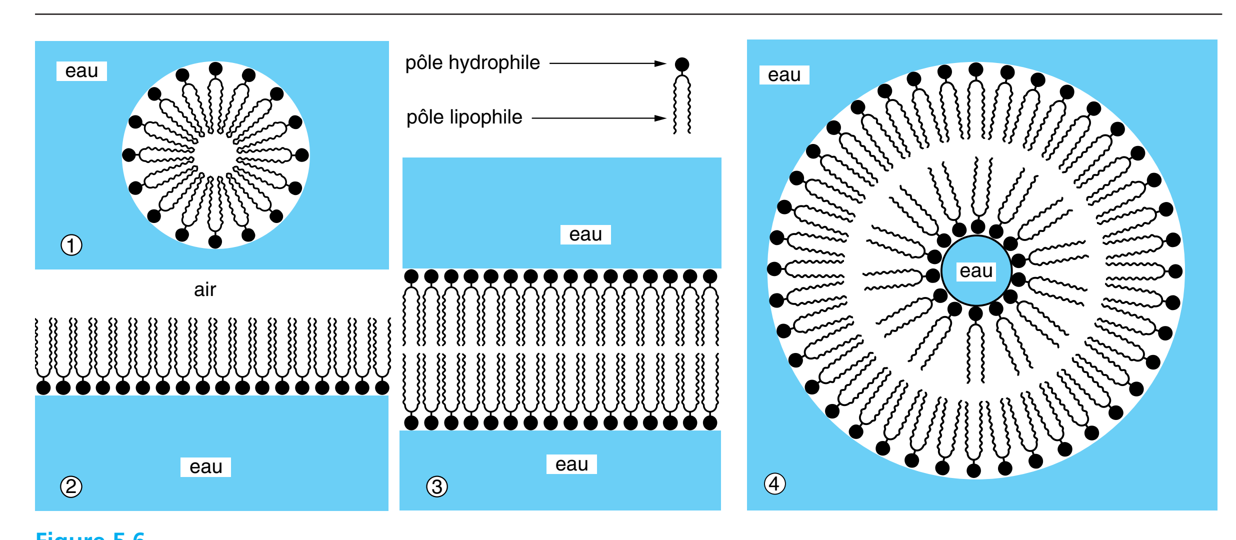


Figure 5.6
Schémas des différentes structures d'autoassemblage des lipides membranaires

(1) Micelle.
(2) Monocouche.
(3) Bicouche plane simple.
(4) Liposome unilamellaire.

2.1.1. Monocouches

Lorsqu'on dépose une goutte d'une solution organique de phospholipides (ou d'acides gras) à la surface de l'eau, ceux-ci forment, après évaporation du solvant, une couche monomoléculaire (**monocouche**) à l'interface air/eau. Ce film occupe le maximum de surface disponible et est constitué de molécules, toutes orientées de la même façon, les groupements hydrophiles plongeant dans l'eau, les chaînes hydrophobes faisant saillie au-dessus de la surface, vers l'air. L'étude biophysique de tels films artificiels est d'un intérêt considérable pour la compréhension de la structure et des propriétés des membranes biologiques (en particulier leur cohésion).

2.1.2. Micelles

Ces structures sont obtenues lorsqu'on agite violemment un mélange d'eau et de lipides. Étant insolubles, ces derniers ne peuvent se disperser individuellement ; en revanche, ils forment des microgouttelettes constituées de centaines ou de milliers de molécules, dont le cœur est formé des chaînes hydrophobes et dont la surface entre en contact avec l'eau environnante grâce aux têtes hydrophiles ; ce sont les **micelles**. Leur taille n'excède jamais quelques nanomètres de diamètre (en fait, le double de la longueur des acides gras).

2.1.3. Bicouches

Dans certaines conditions expérimentales, il est possible d'obtenir, au lieu de micelles, des structures constituées de deux couches de lipides opposées par leurs domaines hydrophobes. Ces **bicouches** peuvent être planes ou bien, lorsqu'on disperse mécaniquement les phospholipides dans l'eau (de façon assez violente), s'organiser en vésicules closes appelées **liposomes**.

Les bicouches planes obtenues à partir de lipides connus sont très utiles pour étudier les phénomènes de perméabilité membranaire car on sait séparer, grâce à elles, deux compartiments aqueux dont la composition en solutés est contrôlable. De plus, des bicouches asymétriques (dont la composition lipidique est différente pour les deux monocouches juxtaposées) sont aisément réalisables. Enfin, des édifices constitués de plusieurs bicouches planes superposées, rappelant certaines structures membranaires biologiques (par exemple, les gaines de myéline des axones), ont permis de mieux comprendre leur architecture fine. Les liposomes se classent en deux catégories :

- ceux dits **multilamellaires**, formés de plusieurs membranes concentriques limitant une cavité (ou lumière) de faible diamètre ;
- ceux dits **unilamellaires**, dont la taille peut varier de 20 nm à près d'1 µm.

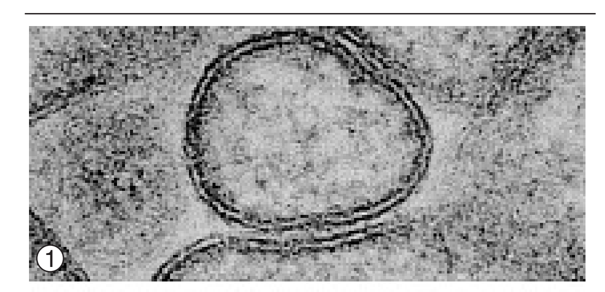
Tous ces assemblages moléculaires sont analysables par la microscopie électronique : coloration négative, cryofracture, ou par les méthodes de diffraction des rayons X. L'utilisation de mélanges de plus en plus complexes de lipides, et dont la composition se rapproche de celles des membranes biologiques, a permis de mieux comprendre l'organisation de ces dernières. La possiblilité de construire des **protéoliposomes,** en ajoutant des protéines hydrophobes à ces mélanges, permet d'étudier la façon dont elles s'insèrent éventuellement au sein des bicouches artificielles et les propriétés nouvelles qu'elles leur confèrent.

Outre leur intérêt fondamental lié à l'existence d'une cavité aqueuse interne, ce qui autorise de nombreuses études sur la perméabilité des membranes phospholipidiques, les liposomes constituent potentiellement des structures ayant de nombreuses applications de type thérapeutique et cosmétologique (Voir : Perspective biomédicale).

2.2. Données initiales de la microscopie électronique : la structure trilaminaire

Avant même l'avènement de la microscopie électronique, toutes les analyses biochimiques ou physiologiques faites sur les membranes convergeaient vers un modèle basé sur l'existence d'une bicouche phospholipidique de part et d'autre de laquelle seraient associées, d'une manière ou d'une autre, des protéines diverses ; c'est le **sandwich lipido-protéique** de DANIELLI et DAWSON (1935). Lorsque le pouvoir séparateur de cette nouvelle technique d'observation a été suffisant (de l'ordre du nm) et que les techniques de préparation des échantillons ont été fiables, la structure fine des membranes a pu être enfin découverte.

En coupe transversale, les images montrent une **structure** typique dite **trilaminaire**, car deux feuillets sombres (2,5 nm) encadrent un feuillet clair (3 nm) (voir *figure* 5.7). Cette organisation se retrouvant, à de faibles variations près, pour toutes les membranes cellulaires, le concept de **membrane unitaire** a été dégagé en 1959 par ROBERTSON. Comme toute théorie unificatrice, cette hypothèse, selon laquelle toutes les membranes sont structurées de la même façon, a eu le mérite de susciter une abondante expérimentation et de faire cesser bien des spéculations. Cependant, elle a eu aussi tendance à ignorer les nombreuses variations (d'épaisseur et d'aspect général des membranes) que remarquaient les observateurs.



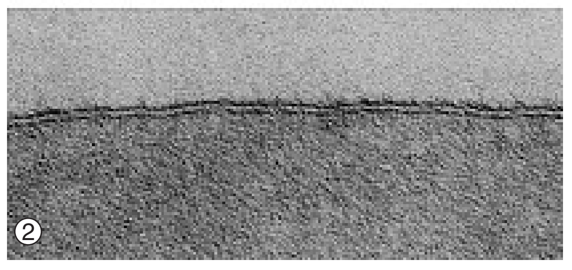


Figure 5.7

Clichés de microscopie électronique montrant la structure trilaminaire caractéristique des membranes biologiques

(1) Membranes de microvillosités de cellules stomacales.
(2) Membrane plasmique d'hématie de Mammifère.
L'épaisseur de ces membranes est de 7 à 8 nm ; fixation par le $KMnO_4$ (x 220 000). (Clichés Labo BC4, Orsay).

La structure trilaminaire révélée par le microscope électronique semblait confirmer, en première approximation, l'hypothèse du sandwich lipido-protéique : la couche centrale claire, par ses dimensions, correspondrait aux deux épaisseurs des chaînes d'acides gras des lipides, tandis que les couches foncées correspondraient à leurs extrémités polaires et à la couverture de protéines (voir *figure* 5.8). Ce modèle s'appliquait cependant avec difficulté à certaines membranes cellulaires,

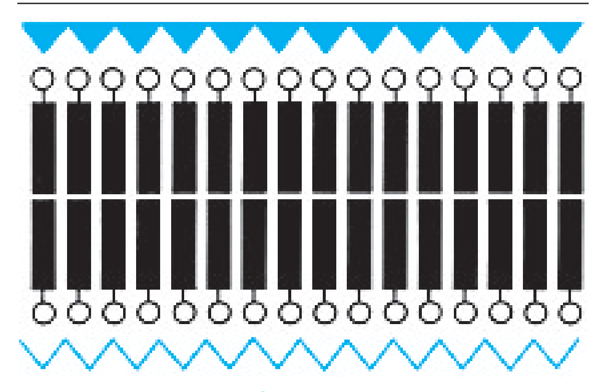


Figure 5.8

Schéma interprétatif de la membrane unitaire donné par ROBERSTON (1959)

comme celles des mitochondries, qui présentaient en coupe un aspect granuleux ; de plus, certaines conséquences prévisibles de cette structure étaient en contradiction avec les données physiologiques. La présence d'un film continu de lipides semblait par exemple incompatible avec la perméabilité à l'eau et à certains composés polaires, comme on l'a signalé au § 1.1. De nouvelles hypothèses ont donc été proposées, tout au long des années 60, pour adapter le modèle initial : l'existence de ponts hydrophiles entre les deux faces de la membrane a été évoquée, de même que celle d'unités répétitives construites à base de micelles ou d'agrégats mixtes lipides/protéines.

Encore une fois, c'est la mise au point d'une nouvelle technique, à la fin de cette décennie, qui a permis d'avancer et de régler, de façon définitive semble-t-il, la question de l'architecture membranaire ; il s'agit de la technique de **cryofracture**.

2.3. Apport de la technique de cryofracture : la structure « en mosaïque »

Cette technique constitue un développement de la technique dite d'**ombrage métallique** mise au point dix ans plus tôt, et décrite dans le chapitre 3 ; elle est d'abord basée sur la congélation très rapide d'un tout petit échantillon biologique (moins de 1 mm^3), dans de l'azote liquide (– 196 °C). Il s'agit donc d'une fixation physique qui supprime tous les problèmes potentiels d'artefacts, liés aux altérations ou interactions chimiques survenant au cours de la fixation chimique, de la déshydratation et de l'inclusion, dans les méthodes classiques. La seule difficulté à surmonter est l'apparition de cristaux de glace ; la congélation doit être très rapide (d'où la petitesse de l'échantillon) et l'on est parfois amené à utiliser des milieux « antigel », tels que le glycérol.

Les premières images fournies par cette technique ont complètement dérouté les observateurs car l'aspect des membranes était inattendu, compte tenu des modèles ayant cours à cette époque. Les surfaces observées, supposées être celles de la membrane plasmique (ou celles des organites), apparaissaient en effet très granuleuses, présentant des « paquets » de grains de tailles variées, répartis de manière plus ou moins dense, sur un fond lisse et uniforme (voir *figure* 5.10). Ce type de structure devant se rapprocher davantage, en théorie, de l'état natif des membranes, il a fallu complètement revoir les modèles d'architecture membranaire pour en tenir compte.

L'utilisation de liposomes enrichis en protéines membranaires purifiées (**protéoliposomes**) a confirmé que les granules observés étaient constitués de protéines, et que celles-ci étaient enchâssées dans une bicouche phospholipidique continue, elle-même en contact direct avec les phases aqueuses situées de part et d'autre (le fond lisse vu sur les répliques). Comme nous l'avons vu plus haut, cette technique permet d'observer non seulement la surface des membranes, mais aussi d'étudier l'intérieur de celles-ci car la fracture passe fréquemment entre les deux couches de phospholipides apposées, « arrachant » les protéines qui y sont incluses ; elles se retrouvent donc sur une face ou sur l'autre de la fracture.

ENCART TECHNIQUE

Cryofracture et cryodécapage

L'étape cruciale du protocole est la fracture, et non la coupure, de l'échantillon congelé, et ceci à très basse température. Cette **cryofracture** dégage une surface irrégulière à travers l'échantillon, et c'est cette surface qui sera observée. Il a été montré que, de façon générale, le plan de fracture passe à l'intérieur des membranes cellulaires, au sein même de la bicouche phospholipidique, car celle-ci représente une zone de moindre résistance par rapport à la glace environnante (voir *figure* 5.9). On réalise ensuite le décapage de la surface de l'échantillon en sublimant, sous vide et à basse température, une fine pellicule de glace superficielle ; ce qui a pour effet d'augmenter très légèrement les reliefs des structures (**cryodécapage**).

La suite des opérations consiste en un ombrage métallique unilatéral, sous vide et à froid, pour renforcer les reliefs (voir chapitre 3) ; un film de carbone uniforme et très fin est ensuite vaporisé par dessus la surface métallisée pour la renforcer et couvrir les zones non atteintes par le métal. On a ainsi réalisé un vrai moulage extrêmement précis de la surface fracturée de l'échantillon : la **réplique** ; c'est elle qui est observée au microscope électronique à transmission. Avant l'observation, il aura fallu la décoller de l'échantillon par décongélation, bien la nettoyer par un traitement sévère (eau de Javel, mélange sulfochromique), la rincer et enfin la déposer sur une grille de microscopie électronique.

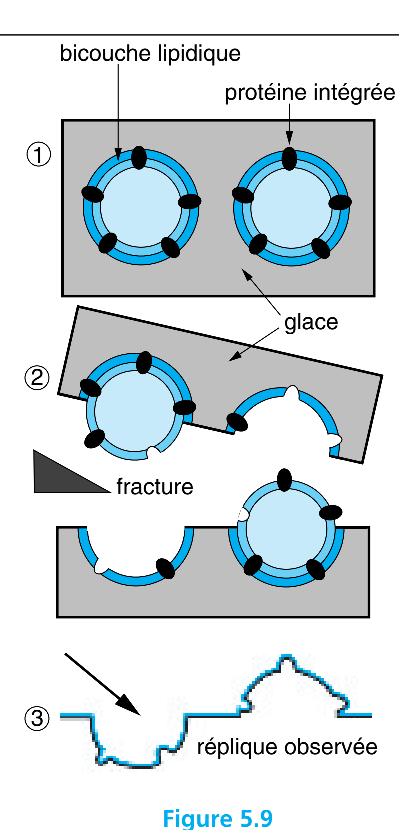


Figure 5.9

Principe de la formation des images lors du protocole de cryofracture/cryodécapage

(1) Exemple de deux protéoliposomes inclus dans la glace. **(2)** Fracture de la glace dégageant soit la partie concave (à gauche), soit la partie convexe (à droite) des vésicules. **(3)** Aspect de la réplique métallique obtenue après ombrage unidirectionnel (flèche) et vaporisation de carbone. La fracture fait apparaître la face supérieure ou l'empreinte de la face inférieure des protéines intrinsèques, en fonction de leur degré d'enfouissement dans la bicouche. La réplique métallique de cette surface présente ainsi des « creux » ou des « bosses », selon les cas.

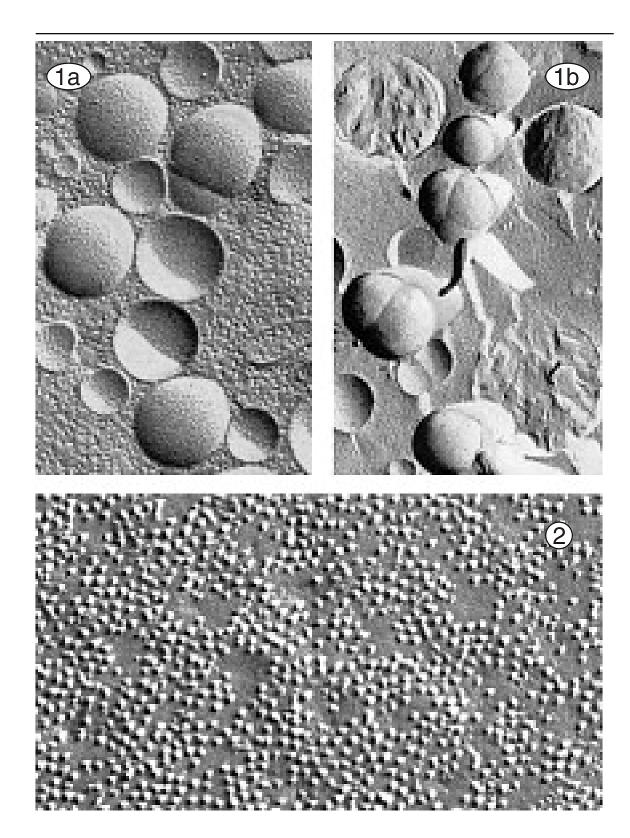


Figure 5.10

Clichés obtenus par cryofracture

(1a) Aspect de liposomes contenant des protéines intégrées à la bicouche (protéoliposomes) et ayant une surface rugueuse.
(1b) Aspect de liposomes lisses constitués uniquement de lipides.
(2) Aspect d'une membrane biologique (ici la membrane cytoplasmique d'un ovocyte de Xénope ; x 75 000) (Clichés P. Van Gansen, Bruxelles).

Une technique récente, dérivée de celle-ci, utilise un **décapage profond** par sublimation très poussée des surfaces fracturées, après éventuellement un court traitement à l'aide d'un détergent doux qui élimine les protéines solubles superficielles ; elle nécessite une congélation ultrarapide dans l'hélium liquide, à – 269 °C. Les documents obtenus sont d'une grande lisibilité et d'une clarté remarquable.

L'intérêt principal de cette approche a été de démontrer que les protéines membranaires étaient toutes globulaires et qu'elles ne tapissaient pas de manière continue les feuillets lipidiques. Cette forme globulaire étant celle déjà connue pour des protéines à fonctions biologiques telles que la catalyse ou le transport, ce type d'image permettait d'envisager sous un angle nouveau les diverses fonctions attribuées aux membranes. On a donné le nom de structure en **mosaïque** à cet aspect nouveau de l'organisation de la surface membranaire, se présentant sous la forme d'amas, plus ou moins denses, de granules.

2.4. Le modèle actuel de la « mosaïque fluide »

La structure trilaminaire des membranes biologiques, qui est systématiquement vue lorsque les techniques histologiques classiques sont mises en œuvre, est donc un artefact. Son origine est, somme toute, aisée à comprendre. Les traitements chimiques imposés par la fixation et l'inclusion des

échantillons conduisent à la dénaturation des protéines membranaires globulaires enchâssées dans la bicouche lipidique. Ceci a pour conséquence la perte des relations étroites établies normalement entre les deux constituants de le membrane, les protéines dénaturées étant alors exclues de la bicouche et s'étalant, de part et d'autre, pour former un sandwich. Ce qui n'avait aucune importance lorsque les analyses cytologiques se faisaient au moyen du microscope photonique, devenait crucial à l'échelle des ultrastructures et des édifices supramoléculaires vus en microscopie électronique.

La *figure* 5.11 décrit l'organisation des membranes telle qu'elle est actuellement admise ; il s'agit du modèle de Singer et Nicolson (1972). On définit diverses catégories de protéines en fonction de leurs relations plus ou moins étroites avec la bicouche lipidique.

– Les protéines dites **intrinsèques** ou **intégrales** contractent des liens forts et stables, bien que non covalents, avec les lipides. Elles traversent la bicouche et peuvent présenter des domaines dépassant, de façon importante, de part et d'autre de celle-ci : elles sont alors transmembranaires. Dans certains cas, seul un domaine dépasse significativement d'un côté ou de l'autre : elles sont dites intrinsèques externes ou internes, suivant leur disposition (par rapport à la cellule ou à la lumière d'un organite). Certaines de ces protéines sont accrochées à la bicouche par un dispositif d'ancrage particulier qui sera examiné dans le prochain paragraphe.

– Les protéines dites **extrinsèques** ou **périphériques** n'entrent pas directement en contact avec la bicouche, mais sont accrochées par des liaisons faibles aux protéines précédentes (liaisons du type de celles stabilisant les structures quaternaires des protéines). On distingue aussi celles qui sont internes et celles qui sont externes.

Comme nous le verrons plus loin, l'identification de ces catégories est essentiellement opérationnelle, c'est-à-dire qu'elle a d'abord une base technique. Nous qualifierons tout de suite ce modèle de **mosaïque fluide**, car l'édifice ainsi construit n'est stabilisé que par des liaisons faibles (aussi bien entre les lipides eux-mêmes qu'entre les lipides et les protéines), de sorte qu'il manifeste des propriétés caractéristiques de mobilité latérale de ses constituants, de souplesse et de fluidité globales, que nous mettrons en évidence et dont nous analyserons les divers paramètres.

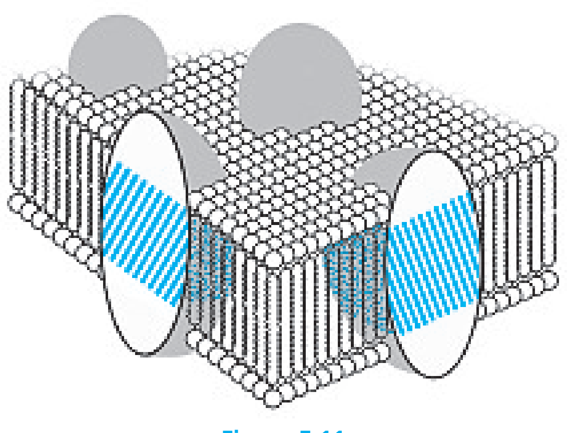


Figure 5.11

Modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson en 1972, et actuellement admis pour toutes les membranes biologiques

Dans ce modèle, les protéines sont profondément enfouies dans la bicouche, et en contact étroit avec les lipides membranaires par leurs domaines hydrophobes, plus ou moins importants (hachurés), tandis que leurs domaines hydrophiles dépassent de part et d'autre. Seules des protéines intrinsèques ont été représentées sur ce schéma.

2.5. Caractéristiques particulières des protéines membranaires

Les protéines membranaires possèdent des caractéristiques physicochimiques très différentes selon qu'elles sont du type extrinsèque ou intrinsèque.

• Les protéines du type extrinsèque, en raison de leur localisation en dehors de la bicouche, ont des propriétés classiques de protéines solubles dans l'eau. Les interactions protéines/membrane (qui sont en fait de type protéine/protéine) sont facilement rompues par de simples modifications de force ionique ou de pH du milieu, qui interviennent essentiellement au niveau des liaisons électrostatiques. L'étude de la structure et des fonctions de ces protéines est conduite, après qu'elles aient été facilement décrochées de la membrane, exactement de la même façon que pour les autres protéines cellulaires hydrosolubles.

• Les protéines du type intrinsèque sont au contraire des protéines très particulières en ce sens qu'elles doivent, pour se maintenir en place, contracter des relations stables avec une composante hydrophobe (le cœur de la bicouche phospholipidique) ; elles comportent donc elles-mêmes

de larges domaines hydrophobes leur permettant de se « dissoudre » dans cette bicouche. Les méthodes classiques de purification ne peuvent s'appliquer à ces protéines car elles sont, d'une part, difficiles à extraire de la composante lipidique non hydrosoluble et, d'autre part, en l'absence de celle-ci, elles ont tendance à se dénaturer et à s'agréger, ce qui conduit à la perte de leurs fonctions et à leur précipitation.

Seul l'usage relativement récent de détergents appropriés a permis de résoudre ce double problème et d'analyser les protéines membranaires. De plus, la reconstitution *in vitro* de vésicules artificielles porteuses de ces molécules purifiées (protéoliposomes) autorise, grâce à eux, des approches fonctionnelles dont divers exemples seront donnés dans le chapitre 10.

2.5.1. Des outils importants : les détergents

Les **détergents** sont, comme les lipides, des molécules amphiphiles ; ils peuvent être chargés électriquement ou neutres (voir *figure* 5.12). Ce sont des molécules naturelles : sels de Na^+ ou K^+ d'acides gras (savons), ou bien artificielles, dont la chimie fournit une grande variété ; elles forment naturellement des micelles en présence d'eau. On rappelle que le pouvoir dégraissant des détergents tient au fait que ces composés sont capables de piéger des molécules lipidiques au sein de leurs micelles et donc de les extraire de leur support et ainsi de les solubiliser (ce qui permet de les éliminer). Ce pouvoir général des savons est utilisé par les biochimistes pour dissoudre les bicouches lipidiques et extraire les protéines intrinsèques sans les détériorer.

Encart technique

Utilisation des détergents dans l'étude des membranes

Si l'on mélange en faible concentration des détergents à des membranes biologiques, les queues hydrophobes de ceux-ci s'intercalent simplement dans la bicouche sans la détruire. Lorsque cette concentration augmente, les détergents désorganisent la bicouche et forment des micelles mixtes incluant une quantité plus ou moins grande de lipides. Les protéines membranaires sont en même temps solubilisées par le détergent qui se fixe sur elles en déplaçant les lipides qui leur étaient étroitement associés. On obtient des complexes protéine/détergent solubles, avec parfois quelques molécules de lipides restant accrochées, dans lesquels les molécules protéiques conservent éventuellement leur configuration native (voir *figure* 5.13).

Un volet important de l'utilisation des détergents, qui sera uniquement mentionné ici, est la possibilité qu'ils offrent de reconstituer des vésicules unimembranaires incluant de telles protéines dans la bicouche ; ce sont les **protéoliposomes**. À partir de mélanges formés de complexes « protéine membranaire purifiée/détergent » et de micelles mixtes « phospholipide/détergent », et après dialyse du détergent, de tels édifices se construisent spontanément ; la technique reste cependant délicate et n'est pas toujours couronnée de succès. On a pu ainsi obtenir des systèmes protéiques membranaires fonctionnellement actifs incluant, par exemple, des transporteurs actifs d'ions (pompe

$CH_3—(CH_2)_{11}—O—SO_3^-\ Na^+$ Dodécyl sulfate de sodium (SDS)

$CH_3—C(CH_3)_2—CH_2—C(CH_3)_2—C_6H_4—(O—CH_2—CH_2)_n—OH$ Polyoxyéthylène-octylphénol (Triton X-100)

Déoxycholate de sodium (noyau stéroïde portant HO, H, deux CH_3, et la chaîne $CH(CH_3)—(CH_2)_2—CO—O^-Na^+$)

Figure 5.12
Formules de quelques détergents classiques utilisés dans l'étude des membranes et dans la purification de leurs protéines constitutives
Le déoxycholate de sodium est une molécule retrouvée dans les sels biliaires

Na⁺/K⁺ ATP dépendante, voir chapitre 6) ou, inversement, des complexes générateurs d'ATP (ATP synthétases, voir chapitre 10), nécessitant des gradients de concentration de protons pour leur activité.

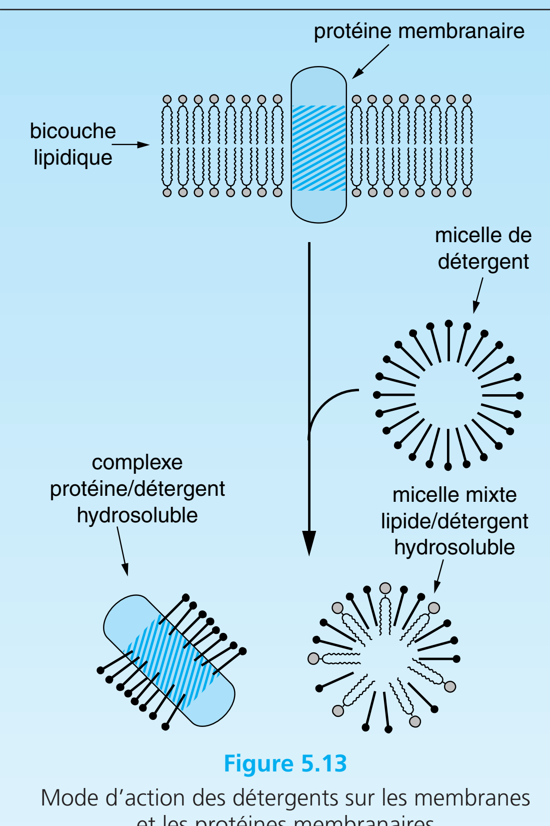


Figure 5.13
Mode d'action des détergents sur les membranes et les protéines membranaires

La solubilisation des protéines membranaires se fait sous la forme de complexes protéine/détergent hydrosolubles. Les lipides membranaires se retrouvent sous la forme de micelles mixtes.

Les détergents chargés électriquement (ou ioniques, comme le **SDS**), sont très efficaces et solubilisent les protéines les plus hydrophobes, mais conduisent à leur dénaturation, souvent irréversiblement (c'est vrai pour toutes les protéines en général, d'ailleurs). Il existe des détergents plus doux (non ioniques), comme le **Triton X-100**, le Tween ou le **déoxycholate de Sodium**, qui se fixent seulement sur les domaines hydrophobes des protéines membranaires ; en formant un manchon localisé autour d'elles, ils les solubilisent sans les dénaturer.

Comme on le verra plus loin, de très nombreuses protéines membranaires ont pour fonction de transférer un composé d'un compartiment à un autre, situés de part et d'autre de la membrane. Cette fonction ne peut se concevoir en dehors d'une structure et ne peut donc s'étudier en « phase soluble » et de façon simple, comme c'est le cas, par exemple pour les enzymes classiques.

2.5.2. Approche expérimentale de la topographie des membranes

L'utilisation des détergents suivie de l'électrophorèse des protéines donne accès à la composition globale des membranes, mais pas à leur architecture précise, c'est-à-dire la disposition de ces molécules par rapport à la bicouche elle-même et par rapport à l'intérieur ou l'extérieur de la cellule ou du compartiment analysés. Diverses méthodes, directes ou indirectes, fournissent des renseignements à ce sujet.

Une première technique consiste à marquer radioactivement les protéines en place dans la bicouche au moyen d'un système enzymatique : ce système utilise une enzyme, la **lactoperoxydase**, capable de fixer un atome d'iode radiomarqué (^{125}I) sur un résidu tyrosine accessible, en présence d'H_2O_2. Mis en présence d'une cellule ou d'une vésicule porteuse de protéines, ce système ne peut marquer que les résidus Tyr appartenant aux domaines externes des protéines car l'enzyme ne peut pénétrer à l'intérieur des cellules ou des vésicules ; tout résidu Tyr situé dans la bicouche ou appartenant à un domaine interne de la protéine est donc inaccessible à l'enzyme. Après le marquage, on solubilise les protéines membranaires et on les soumet à l'électrophorèse. Une autoradiographie permet ensuite de savoir quelles sont, parmi elles, celles qui possèdent un domaine externe (et possédant évidemment de la tyrosine à ce niveau). Le découpage des protéines marquées et purifiées par des protéases et l'étude des fragments obtenus complètent cette analyse en permettant de localiser exactement le ou les résidus le long de la chaîne polypeptidique.

Certains modèles favorables comme les hématies de Mammifères autorisent une étude topographique plus poussée car il est, à partir de fantômes de ces cellules traités par un protocole approprié, possible d'obtenir des **vésicules retournées** (voir *figure* 5.14). Le marquage de ces vésicules retournées par la lactoperoxydase, et l'analyse des protéines radioactives permettent donc d'identifier les protéines transmembranaires (accessibles des deux côtés de la membrane par le marquage) et celles qui ont des domaines seulement tournés vers l'intérieur de la cellule.

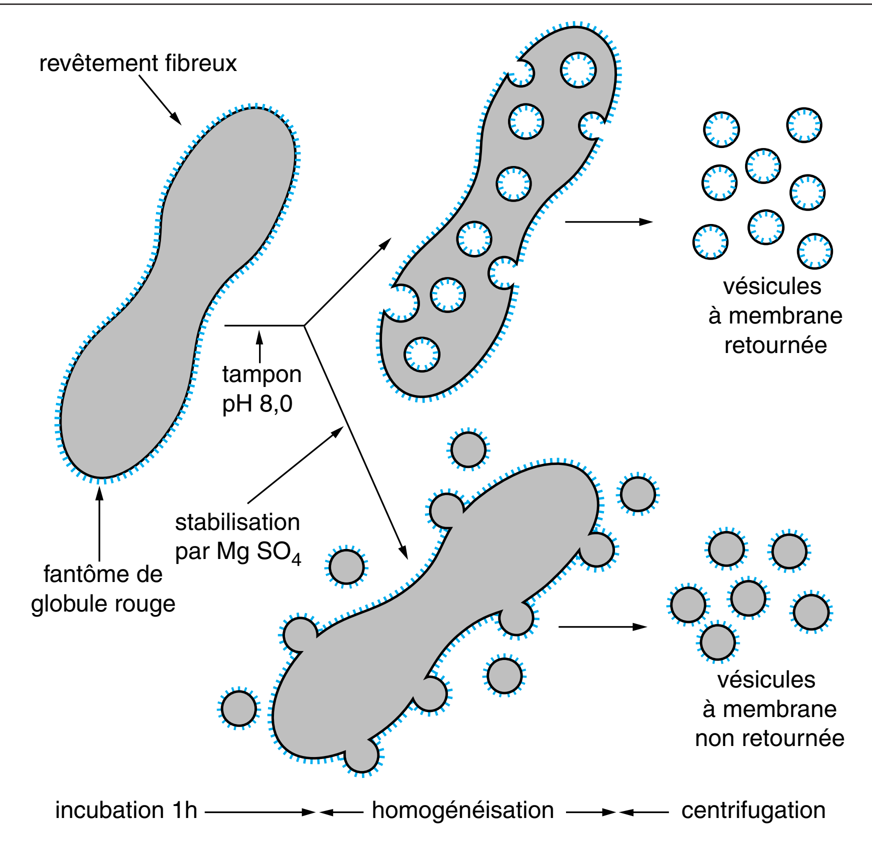


Figure 5.14

Protocole d'obtention de vésicules normales ou retournées, à partir de fantômes d'hématies de Mammifères

La simple manipulation du milieu d'incubation des cellules, en particulier la présence des ions Mg^{2+}, conduit à une vésiculisation contrôlée, dans un sens ou dans l'autre. Après homogénéisation des cellules, les petites vésicules obtenues sont récupérées par centrifugation.
(D'après A. Berkaloff *et al.*, *Biologie et Physiologie cellulaires*, Hermann).

Pour localiser les protéines membranaires, on peut aussi utiliser des anticorps marqués obtenus contre ces protéines purifiées (anticorps polyclonaux) ou non (anticorps monoclonaux). Ces anticorps sont aussi bien employés pour des visualisations *in situ* que pour des études biochimiques, après électrophorèse, par exemple. La distinction entre protéines extrinsèques et intrinsèques, parmi toutes celles repérées grâce à la technique précédente, se fait sur la base de la solubilisation des premières après des traitements doux des cellules ou des vésicules (variation de la force ionique ou du pH du milieu) et des lavages qui permettent de les éliminer (par centrifugation).

Un bon critère qui différencie les protéines ou leurs domaines situés dans le territoire extracellulaire (pour celles appartenant à la membrane plasmique), et en général celles tournées du côté non-hyaloplasmique de la plupart des membranes cellulaires, est constitué par la présence de motifs glucidiques. Ceux-ci peuvent être détectés grâce à des gels d'électrophorèse des protéines entières ou de peptides issus de digestions ménagées, par des colorations appropriées de type cytochimique.

Une approche indirecte, liée au développement récent des techniques du génie génétique et à la multiplication des séquences de protéines qui n'ont été ni isolées ni purifiées, permet de tenter de localiser les domaines hydrophobes le long des chaînes polypeptidiques. On sait que les chaînes latérales des acides aminés sont plus ou moins hydrophobes (voir chapitre 1) et il est possible de quantifier ce degré d'hydrophobicité à partir d'études biophysiques directes ou bien, par analogie, à partir d'études statistiques concernant des protéines connues (solubles ou membranaires) dont la structure tridimensionnelle a été établie. On rappelle à ce sujet que les protéines hydrosolubles enfouissent leurs segments hydrophobes au cœur de la molécule. Une échelle d'hydrophobicité

ayant été déterminée, on recherche dans la séquence des séries d'acides aminés hydrophobes successifs (une vingtaine, au moins) qui sont susceptibles de former des segments hélicoïdaux transmembranaires (voir plus loin). Le diagramme résultant d'une telle analyse est nommé **profil d'hydrophobicité** ; il montre clairement la disposition générale théorique de la protéine par rapport à la bicouche (*figure* 5.15). Des exemples de plus en plus nombreux de protéines analysées par diverses techniques (diffraction électronique, diffraction des rayons X, mesures spectroscopiques…) démontrent le caractère prédictif de cette approche.

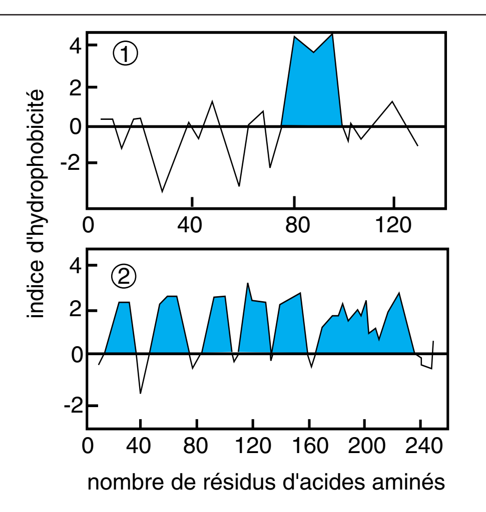


Figure 5.15

Profils d'hydrophobicité de deux protéines membranaires

(1) La glycophorine : protéine à un seul segment hydrophobe.
(2) La bactériorhodopsine : protéine à 7 segments hydrophobes.
Ces derniers sont constitués de 20 à 25 acides aminés et sont identifiés par les parties colorées ; ils sont susceptibles de former autant de segments transmembranaires.
D'après E. Shechter, *Biochimie et Biophysique des membranes*, Masson, 1990.

2.5.3. Disposition des protéines membranaires intrinsèques au sein de la bicouche

La structure tridimensionnelle des protéines est constituée à partir de deux types de structures élémentaires : **l'hélice α** et les **chaînes (ou feuillets) β**. On rappelle que ces motifs sont stabilisés par des liaisons H établies entre les groupes -CO et les groupes -NH des liaisons peptidiques (voir dans la même collection l'ouvrage de G. Hennen, *Biochimie*).

Les protéines membranaires doivent maintenir des liens forts avec un environnement hydrophobe et nous venons de voir que ceci est très souvent réalisé grâce à des segments entiers constitués d'acides aminés eux-mêmes hydrophobes. Il a été établi que ces segments adoptent au sein de la bicouche une disposition en hélice α dont l'avantage thermodynamique est de maintenir vers l'extérieur les résidus hydrophobes et d'immobiliser vers l'intérieur les groupes -CO et -NH (eux-mêmes polaires) sous forme de liaisons H. L'épaisseur du cœur hydrophobe de la bicouche (les deux chaînes « grasses » opposées des acides gras) mesurant environ 3 nm, on calcule aisément que ceci représente 20 acides aminés. Un tour d'hélice a, en effet, un pas de 0,54 nm pour 3,6 résidus. La démonstration de l'existence de segments d'une telle longueur a été régulièrement établie dans les protéines membranaires.

Certaines d'entre elles ont un seul segment de ce type et un domaine de chaque côté de la membrane : elles sont dites **bitopiques** ou « à traversée unique » ; d'autres traversent plusieurs fois (*n*) la bicouche et présentent donc *n*+1 domaines hydrophiles : elles sont dites **polytopiques** ou « à traversées multiples ». Divers exemples sont illustrés dans la *figure* 5.16.

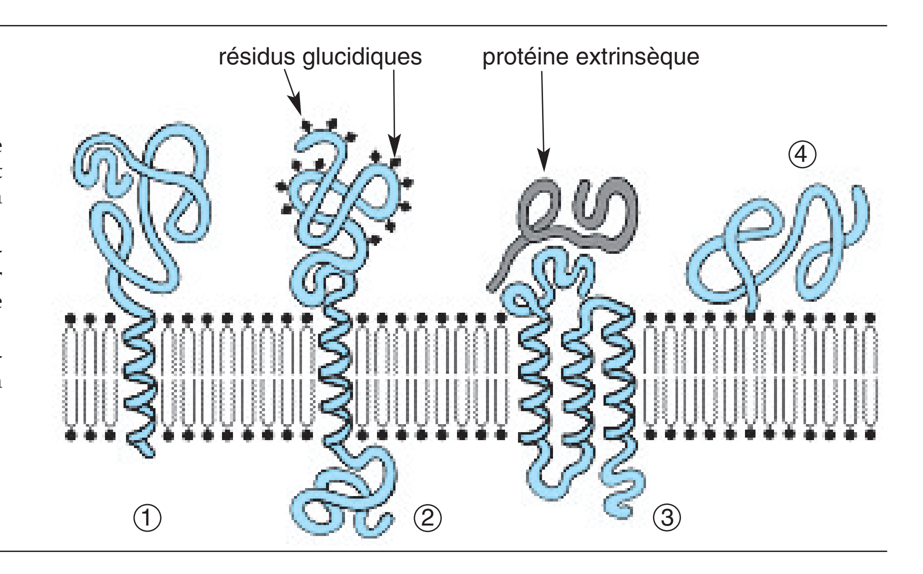
Il existe également des protéines à traversées multiples bâties sur un principe assez différent. Deux segments hélicoïdaux proches au sein de la bicouche peuvent être stabilisés latéralement par des interactions ioniques ou polaires ; cette disposition implique qu'une demi-hélice de chaque hélice soit hydrophobe et l'autre hydrophile pour que toutes les exigences et contraintes physicochimiques soient respectées. On appelle **hélice amphiphile** de tels segments dans lesquels alternent, avec une périodicité adéquate, des acides aminés polaires et non polaires et qui se présentent comme des cylindres à deux faces. Des hélices jointives de ce genre sont susceptibles de constituer des sortes de canaux hydrophiles au sein des protéines intrinsèques transmembranaires. De fait, de nombreux transporteurs d'ions minéraux ou de solutés organiques sont organisés selon ce modèle.

Enfin, on peut imaginer que des feuillets β amphiphiles puissent être construits sur ce principe dans les protéines polytopiques ; quelques cas de cette situation ont effectivement été décrits : la porine des Bactéries Gram$^-$ est un « tonneau » formé de 16 feuillets β antiparallèles.

Figure 5.16

Divers types de protéines membranaires intrinsèques

(1) et **(2)** Protéines à traversée unique, l'une des deux étant fortement glycosylée sur un de ses domaines hydrophiles.
(3) Protéine à traversées multiples (ici, à 3 passages), sur laquelle est accrochée une protéine extrinsèque.
(4) Cas particulier de l'accrochage d'une protéine par un lipide membranaire.



2.5.4. Cas des protéines liées de manière covalente à des acides gras ou des lipides

Pour terminer ce développement, il faut signaler l'existence, longtemps restée anecdotique, de protéines hydrosolubles (comme les extrinsèques) retenues à la bicouche par un acide gras ou un lipide, qui leur sont liés de façon covalente, et les ancrent littéralement dans celle-ci (elles se comportent donc comme des intrinsèques). Ces molécules de liaison hydrophobes (acide palmitique ou myristique ; phosphatidyl-inositol) sont le plus souvent liées en position terminale du polypeptide. De nombreuses protéines ainsi ancrées dans la bicouche seront décrites lors de l'étude des processus de signalisation cellulaire (voir chapitre 13). Certaines protéines authentiquement transmembranaires intrinsèques, comme celles vues plus haut, peuvent en outre renforcer leur accrochage à la bicouche par un dispositif de ce type.

3. PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES MEMBRANES

3.1. Asymétrie membranaire

3.1.1. Asymétrie liée aux lipides

Toutes les membranes biologiques possèdent une bicouche dont la composition en lipides est différente pour chaque monocouche (ou face) ; on parle ainsi d'**asymétrie membranaire** ou de **polarité de structure** des membranes. Seuls le cholestérol et quelques rares lipides se trouvent en quantités équivalentes dans chacune d'elles, car ils ont la possibilité de basculer aisément d'une monocouche dans l'autre, en raison de l'importance relative de leur domaine hydrophobe. Nous décrirons en détail, au cours du chapitre 6, quelques expériences concernant cette question.

Deux exemples illustrant cette notion, relatifs à des types différents de membranes de cellules animales, sont présentés à la *figure* 5.17. On constate que la répartition des phospholipides majeurs est fortement asymétrique : la phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanolamine sont très abondantes sur les faces dites hyaloplasmiques (monocouche interne de la membrane plasmique et externe des vésicules intracellulaires nommées **microsomes**), tandis que la sphingomyéline (et la phosphatidyl-choline, dans le cas des hématies) est essentiellement présente sur la face exoplasmique des membranes. Nous verrons plus loin que la lumière d'une vésicule interne à la cellule est topologiquement équivalente au milieu extracellulaire.

À cette asymétrie liée aux molécules « supplémentaires » qui confèrent leur identité aux phospholipides, il faut ajouter celle due à une composition différente en acides gras. Le degré de saturation différent de ces derniers dans les deux monocouches entraîne une fluidité variable ; la signification physiologique de ce fait n'est pas entièrement comprise. On rappelle enfin que les glycolipides se rencontrent uniquement dans les monocouches non hyaloplasmiques. Une conséquence prévisible de cette différence de composition chimique est que les deux faces d'une membrane n'ont pas la même charge électrique car

les molécules supplémentaires ne sont pas toutes ionisables de la même façon : l'inositol est neutre, la sérine est amphotère, la choline ou l'éthanolamine sont chargées positivement et l'acide sialique des glycolipides est chargé négativement (voir *figures* 5.2 et 5.4). Il faut cependant préciser que toutes ces charges électriques sont neutralisées par des ions de charge contraire.

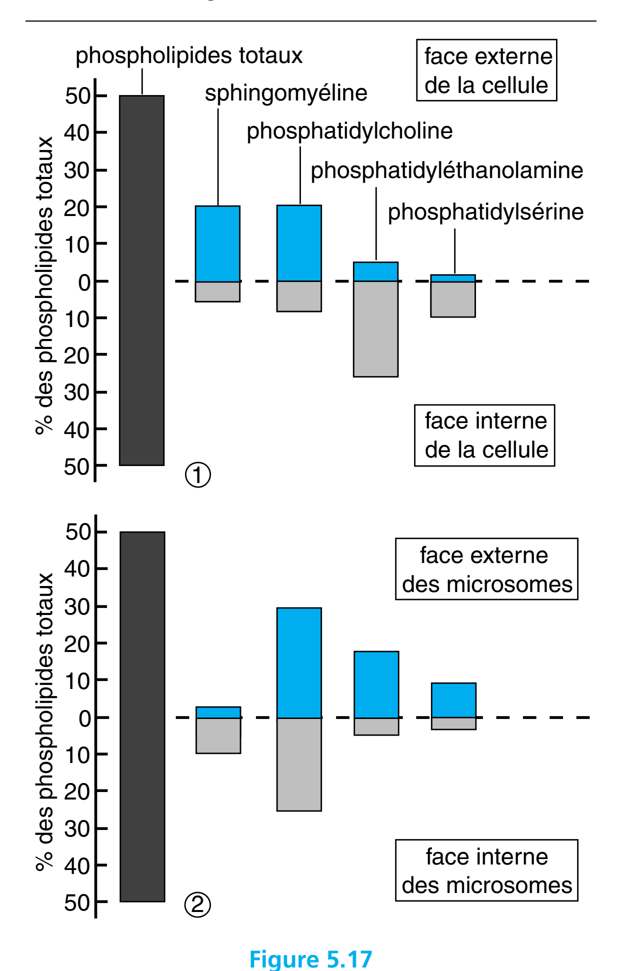


Figure 5.17

Diagrammes montrant la différence de composition en phospholipides des deux faces de la bicouche, pour deux types de membranes de cellules eucaryotiques

(1) Membrane cytoplasmique d'érythrocyte.
(2) Membrane de microsomes de foie de rat.

3.1.2. Asymétrie liée aux protéines et aux glucides

L'asymétrie inhérente aux protéines est une caractéristique fondamentale des membranes biologiques ; toutes leurs propriétés physiologiques reposent sur elle. L'analyse des rapports structure/fonction au niveau de la membrane plasmique et des divers organites le prouvera de façon constante ; nous en aurons un premier aperçu à la fin de ce chapitre. L'asymétrie due aux protéines tient au fait que ces molécules ont une organisation et une orientation bien précises dans la bicouche lipidique, cette dernière étant fixée une fois pour toutes lors de leur mise en place en son sein.

L'asymétrie liée aux glucides est un phénomène « secondaire », en ce sens qu'il n'est qu'un des aspects de celle liée aux deux autres catégories de molécules auxquelles ils sont associés (les glycoprotéines et les glycolipides). L'étude de la membrane cytoplasmique, où elle est particulièrement marquée, nous fournira une illustration claire de cette polarité de structure.

3.1.3. Origine et maintien de l'asymétrie membranaire

L'asymétrie de composition chimique d'une membrane (dite **transversale**) est, dans une certaine mesure, le reflet des compositions des deux milieux qu'elle sépare. Cette remarque est vraie, en particulier, pour les protéines extrinsèques. En fait, cette asymétrie traduit surtout, comme on vient de le voir, des différences spécifiques de composition en lipides des deux monocouches et résulte de la disposition orientée des protéines enchâssées dans la bicouche.

Cette asymétrie caractéristique doit d'abord pouvoir exister, puis ensuite se maintenir au cours du temps. On peut imaginer pour cela une origine double :

– soit elle est le résultat d'une situation figée, tous les constituants membranaires, une fois mis en place, étant dans l'impossibilité absolue de passer d'une monocouche dans l'autre : situation d'équilibre strict ;
– soit elle est le résultat d'une situation dynamique dans laquelle tout constituant peut basculer d'un côté à l'autre, mais dans le cadre d'un contrôle conduisant à un état stationnaire.

Les deux situations existent dans les cellules vivantes ; l'étude des membranes artificielles a permis de faire, une fois de plus, la part des choses dans cette question.

La possibilité de basculement (diffusion transversale ou **flip-flop**) des phospholipides ou des glycolipides dans des bicouches artificielles a été analysée dans des liposomes après marquage chimique des molécules de la monocouche externe et étude de leur passage progressif sur la face interne.

Il apparaît que ce phénomène est très rare (moins d'une fois par mois pour une molécule donnée de lipide) car les parties polaires relativement importantes des lipides membranaires ne peuvent, pour des raisons physicochimiques évidentes, franchir le cœur hydrophobe des bicouches. Seuls les stérols (le cholestérol, en particulier), le diacylglycérol et la céramide, qui ont, au contraire, des domaines polaires très réduits, peuvent basculer aisément et équilibrer passivement leurs concentrations dans les deux monocouches (phénomène de **symétrisation**).

Au sein des cellules vivantes eucaryotiques, les choses sont bien plus complexes et l'on doit considérer, de ce point de vue, deux types de membranes :

– celles qui sont le siège de la synthèse des lipides membranaires et de leur incorporation simultanée dans leur propre structure, grâce à des enzymes incluses dans la bicouche, et qui s'accroissent donc constamment en surface. Il s'agit du réticulum endoplasmique (lisse, pour l'essentiel) ; on parle de **membrane biogénique** ;
– celles qui ne fabriquent pas de lipides mais qui dérivent des premières, plus ou moins directement. Il s'agit de toutes les membranes autres que celles du réticulum : appareil de Golgi, lysosomes, membrane plasmique, organites semi-autonomes… ; on parle alors de **membranes non biogéniques**.

Chez les Procaryotes, la membrane cytoplasmique (la seule le plus souvent représentée) appartient évidemment à la première catégorie.

Comme on le verra dans le chapitre 9, les membranes biologiques doivent, pour se maintenir à l'état de bicouche, posséder impérativement des mécanismes actifs assurant un basculement très rapide (en quelques minutes) de certains des phospholipides néosynthétisés sur la seule face hyaloplasmique. On connaît en fait au moins une protéine-transporteur (ou **facteur de translocation**), faisant elle aussi partie de la membrane du réticulum endoplasmique, qui assure spécifiquement le basculement d'un phospholipide à choline (la phosphatidyl-choline) de la face hyaloplasmique (où il est fabriqué et où il tendrait à s'accumuler) vers la face luminale de l'organite. Ce mécanisme de **diffusion transversale facilitée** (car se faisant dans le sens d'un gradient de concentration, voir chapitre 6) conduit donc à une homogénéisation des concentrations de ce composé dans les deux monocouches (voir *figure* 5.18). L'absence d'un tel transporteur pour la phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanolamine fait que ces dernières restent confinées à la face externe (voir *figure* 5.17). Des facteurs de translocation existent aussi dans la membrane cytoplasmique des Bactéries, chez qui la synthèse lipidique a lieu sur la face de la membrane tournée vers le hyaloplasme.

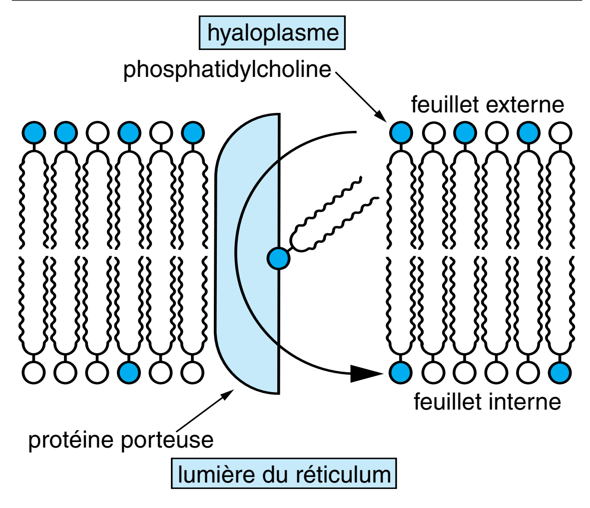


Figure 5.18

Schéma illustrant le principe de la diffusion transversale facilitée, au niveau du réticulum endoplasmique

Celle-ci utilise une protéine transmembranaire spécifique de la translocation de la phosphatidyl-choline.

Dans les membranes non biogéniques, déjà constituées, la diffusion transversale des lipides est spontanément très lente mais non nulle ; on peut calculer que, compte tenu de la durée de vie moyenne des cellules, ces membranes devraient, à terme, perdre leur asymétrie, ce qui n'est pas observé, comme on l'a vu plus haut (*cf.* 3.1.1). On a démontré, dans le cas de la membrane plasmique des hématies et de celle des lymphocytes de Mammifères, qu'il existait une protéine catalysant (grâce à l'hydrolyse de l'ATP) le passage actif de la phosphatidyl-sérine et de la phosphatidyl-éthanolamine de la monocouche externe vers celle interne. Ceci explique la présence, à peu près exclusive, de ces deux lipides sur la face hyaloplasmique de la membrane ; on parle alors de **diffusion transversale active**, car elle se réalise dans le sens contraire du gradient de concentration (il est à noter que le terme de « diffusion » est ici assez inapproprié). Dans ces conditions, l'asymétrie inverse liée aux deux autres phospholipides majeurs (phosphatidyl-choline et sphingomyéline), serait le résultat passif de ce phénomène, ceux-ci étant exclus de la face interne du fait de la diffusion active des deux précédents vers cette face.

La morphologie discoïde des hématies serait également due (en partie, au moins) à ce mécanisme actif car l'appauvrissement en ATP du cytoplasme conduit au maintien de la phosphatidyl-sérine et de la phosphatidyl-éthanolamine sur la face externe. Un surplus de lipides à ce niveau serait responsable de la forme crénelée de la membrane plasmique qui est une conséquence directe de cet appauvrissement.

En ce qui concerne les protéines intrinsèques, on comprend aisément, compte tenu de leurs relations avec la bicouche lipidique et de la taille généralement importante de leurs domaines polaires, qu'il leur soit impossible de basculer dans la membrane.

3.2. Fluidité membranaire

Les membranes sont, par nature des milieux anisotropes, c'est-à-dire qu'elles ne présentent pas les mêmes caractéristiques dans toutes les directions de l'espace. On peut à leur sujet parler de **fluidité**, mais seulement par rapport au plan qu'elles définissent. Cette fluidité traduit la possibilité, manifestée par leurs différents constituants, de bouger sur place ou de se déplacer, parfois sur de relativement grandes distances. Cette propriété est une condition nécessaire pour de nombreuses activités cellulaires ; elle est fonction de plusieurs paramètres, propres à la membrane elle-même, mais aussi à certaines conditions extérieures.

3.2.1. Mise en évidence expérimentale

Diverses méthodes, biophysiques et biologiques, démontrent la fluidité des membranes à travers, en particulier, la possibilité de **diffusion latérale** des lipides et des protéines. On peut également démontrer un mouvement de rotation sur place ou de balancement de ces molécules en utilisant des méthodes biophysiques sophistiquées, de nature spectroscopique (fluorescence et spectroscopie de résonance), qui ne peuvent être décrites dans le cadre de cet ouvrage. Une technique classique, utilisée d'ailleurs dans d'autres domaines que l'étude des membranes, permet d'étudier les mouvements latéraux de leurs constituants : il s'agit de la méthode de **réapparition de la fluorescence après photoextinction** (**FRAP**, en anglais, pour *fluorescence recovery after photobleaching*).

L'expérience suivante, réalisée sur le modèle «hématies de Mammifères», démontre également que les protéines intrinsèques peuvent aisément se déplacer dans le plan de la bicouche lipidique au sein de laquelle elles sont enchâssées. Lorsque des fantômes d'hématies sont incubés dans une solution saline tamponnée à un pH voisin de 7,5, puis analysés par cryodécapage, on observe que les particules intramembranaires (qui représentent les protéines intrinsèques) sont distribuées de façon régulière et éparse au sein de la bicouche lipidique. En revanche, si l'on incube ces mêmes fantômes dans une solution de pH voisin de 5,5, on

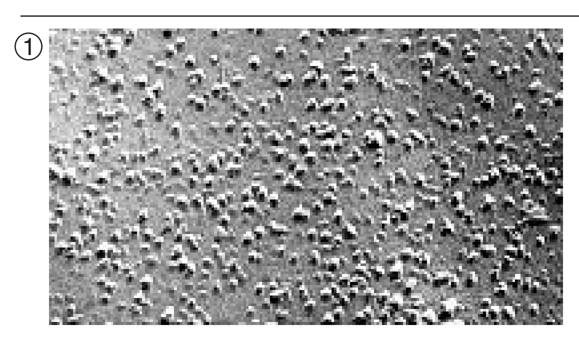
ENCART TECHNIQUE

La méthode de réapparition de la fluorescence après photoextinction

Le principe de cette méthode est simple, même si les choses ne sont pas techniquement aisées à réaliser. Il faut tout d'abord marquer un composant membranaire (lipide ou protéine) par un fluorochrome, dans une cellule vivante immobilisée ou un organite, de sorte qu'on puisse le voir avec un microscope à fluorescence après excitation avec une lumière de longueur d'onde appropriée (voir la microscopie à fluorescence, chapitre 2). Dans le cas des protéines membranaires, ceci se fait le plus souvent grâce à un anticorps spécifique auquel on a greffé un fluorochrome.

Il s'agit en fait, dans un premier temps, d'exciter le fluorochrome d'un tout petit territoire membranaire au moyen d'un fin pinceau de lumière laser, afin de le visualiser, puis on envoie sur ce territoire une lumière de grande intensité qui «brûle» et détruit le fluorochrome (**photodécoloration** ou blanchiment) et supprime la fluorescence émise. On constate que le territoire en question n'émet plus de fluorescence pendant un certain temps, mais que progressivement celle-ci réapparaît, par diffusion des molécules fluorescentes de la périphérie de la zone brûlée, qui remplacent celles de cette dernière. Ce phénomène de récupération de la fluorescence, qui peut être totale, est la preuve de la mobilité latérale des molécules portant le fluorochrome. Il est possible, avec cette méthode, de mesurer un coefficient de diffusion latérale traduisant le degré de fluidité d'une membrane biologique ; les valeurs obtenues sont élevées et telles que les lipides semblent pouvoir se déplacer sur des distances de l'ordre du µm par seconde ! Ces valeurs sont cependant très inférieures à celles mesurées pour les bicouches phospholipidiques pures artificielles.

constate que ces protéines se rassemblent en paquets serrés, formant des agrégats de tailles variées (voir *figure* 5.19). Ce phénomène, qui est parfaitement réversible, témoigne de la possibilité de mouvements de protéines dans le plan des membranes biologiques, et donc de leur fluidité ; il a aussi été démontré au moyen de protéoliposomes ainsi que sur des cellules vivantes.

①


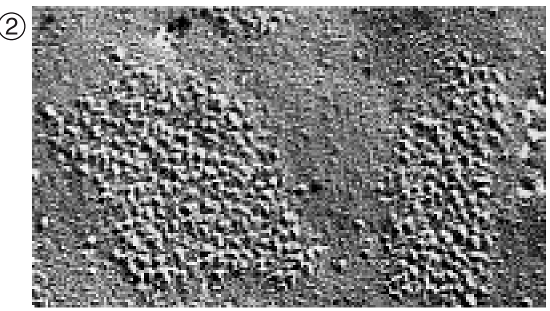
②


Figure 5.19

Aspect en cryodécapage des membranes de fantômes d'hématies de Mammifères, en fonction du pH du milieu d'incubation

(1) pH 7,5 : particules intramembranaires isolées.
(2) pH 5,5 : agrégats de particules.
(Clichés fournis par P. Van Gansen, Bruxelles).

Dans le cas de ces dernières, les expériences concernent essentiellement les propriétés de fluidité de la membrane cytoplasmique, dont la surface et l'accessibilité facilitent l'étude. Les premières indications datent du début des années 70, et ces résultats ont évidemment contribué largement à l'élaboration du concept de mosaïque fluide présenté au paragraphe 2.4 ; nous décrirons une de ces expériences historiques dans le chapitre 6. De même, on a observé *in vivo* (par cryodécapage ou immunofluorescence) que si des cellules isolées, telles que des lymphocytes, sont mises en présence d'anticorps dirigés contre une protéine particulière de leur surface, ses molécules se réunissent progressivement en plages de grande taille alors qu'elles étaient jusque-là distribuées de manière diffuse et homogène dans la membrane plasmique. La raison est que les anticorps, qui sont bivalents, conduisent au rapprochement de ces molécules en entraînant un phénomène de réticulation entre elles ; la fluidité de la membrane est ici aussi directement démontrée.

De nombreuses autres expériences ont permis de préciser les modalités de cette diffusion latérale. Dans les membranes naturelles, il s'avère que toutes les protéines, analysables individuellement, ne diffusent pas à la même vitesse, certaines pouvant même être bloquées au niveau de structures intra- ou extracellulaires.

3.2.2. Limitations à la diffusion latérale des protéines et des lipides dans les membranes biologiques

La comparaison des vitesses de diffusion mesurées dans des protéoliposomes et dans les membranes biologiques, pour une protéine donnée qui a pu être purifiée, montre qu'elle est environ dix fois plus rapide dans les protéoliposomes. Divers mécanismes de résistance à la diffusion sont envisageables :

– des interactions stables avec d'autres protéines de surface, identiques ou différentes, par l'intermédiaire de domaines polysaccharidiques (cas des glycoprotéines) peuvent conduire à la formation d'agrégats de grande taille et diffusant difficilement ;
– des phénomènes de « cristallisation » de protéines, comme c'est le cas dans la **membrane pourpre** des Halobactéries (voir chapitre 6), dans les plaques électriques de certains poissons, pour le récepteur à l'acétylcholine, ou dans certaines jonctions intercellulaires dites communicantes ;
– des interactions indirectes, au sein même de la cellule, avec des constituants du cytosquelette, en particulier les microfilaments ou les filaments intermédiaires (points de contact focaux et jonctions intercellulaires). Certaines protéines intrinsèques entrent même en contact à la fois avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire, ce qui constitue alors un double système d'immobilisation (voir le chapitre 11).

Dans certains types de cellules, en particulier au sein des épithéliums, il existe des dispositifs membranaires qui restreignent la diffusion des pro-

téines (et peut-être celle des lipides) à des territoires ou des domaines spécifiques de la surface cellulaire. Ceci est très important car c'est le seul moyen de maintenir une polarité structurale et donc une spécialisation fonctionnelle à ces cellules. Le cas le plus typique est celui des cellules absorbantes (les entérocytes, par exemple), qui doivent posséder deux « faces » ayant des caractéristiques de perméabilité différente pour qu'un transfert unidirectionnel de molécules ou d'ions ait lieu à travers elles. On parle de **barrières de diffusion** pour désigner ces dispositifs (comme les jonctions intercellulaires dites « serrées ») qui empêchent une homogénéisation complète des constituants membranaires (voir chapitre 14).

Compte tenu de tout ce qui précède, on comprend aisément que les lipides eux-mêmes ne puissent se déplacer dans ces membranes riches en protéines (dont certaines sont bloquées) aussi librement que dans des bicouches artificielles exclusivement lipidiques.

3.2.3. Facteurs influençant la fluidité

Le degré de fluidité des membranes est conditionné par des facteurs externes, parmi lesquels le plus important est la **température**. En effet, la conformation des chaînes d'acides gras des lipides est très sensible à l'agitation thermique ; une élévation de la température entraîne une mobilité accrue et des déformations des chaînes qui ne sont étirées au maximum et en contact étroit qu'à basse température. L'expérience courante montre bien que les corps gras sont solides à basse température et liquides au-delà d'une température caractéristique, qui est fonction de leur nature chimique ; on parle de **transition de phase** pour désigner ce changement d'organisation moléculaire. De même, dans les membranes, les phospholipides et les glycolipides peuvent adopter des dispositions plus ou moins serrées, et contracter des liaisons (hydrophobes) par conséquent plus ou moins stables.

À une température élevée, l'expansion latérale des chaînes d'acides gras s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur de la bicouche et d'une augmentation globale de sa surface ; la fluidité est alors maximale. À l'inverse, on peut considérer que les membranes biologiques ont tendance à figer aux basses températures. Il est important de garder à l'esprit que les cellules sont adaptées à vivre à une température donnée, et que la composition de leurs membranes est forcément fonction de celle-ci ; nous en verrons des exemples plus loin. Lorsque des cellules de Mammifère cultivées normalement à 37-40 °C sont brutalement portées à une température de 0-4 °C, leurs membranes deviennent instantanément solides et toutes les activités qui leur sont associées (indépendamment du ralentissement de l'activité chimique générale) sont supprimées.

La composition en acides gras des lipides membranaires et la richesse en cholestérol sont des facteurs internes déterminant de façon importante la fluidité. Tout d'abord, la longueur des acides gras entre en jeu car la solidité des interactions hydrophobes latérales entre leurs chaînes est, on le comprend aisément, une fonction directe de celle-ci. De plus, la présence ou l'absence de doubles liaisons (acides gras insaturés ou saturés) conditionne directement la conformation et la mobilité des chaînes et influe ainsi sur la fluidité ; on rappelle que la différence de comportement entre les huiles et les graisses, qui se distinguent par leur température de fusion, est basée sur cette même différence chimique. En résumé, plus une bicouche est riche en acides gras courts et insaturés, plus elle constitue un assemblage souple et fluide, dont la température de transition « gel/liquide » est basse.

La proportion de cholestérol dans les bicouches, qui peut être élevée et atteindre parfois 25 % des lipides totaux, est un paramètre important de la fluidité. Par sa conformation (rigide au niveau du noyau tétracyclique, souple au niveau de la chaîne hydrophobe) et sa position par rapport aux autres lipides, il peut moduler la fluidité liée à ces derniers (voir *figure* 5.20). Son effet varie en fonction de la composition globale de la membrane ; son encombrement tend à écarter les chaînes rigides d'acides gras saturés (et donc à augmenter la fluidité) et au contraire à stabiliser les chaînes insaturées, qui sont au départ moins tassées les unes sur les autres (diminution de la fluidité). Par rapport à l'action de la température, il présente aussi un effet tampon puisqu'il tend à empêcher les acides gras d'entrer en contact étroit et d'établir des liens solides lorsque la température de transition est atteinte, et au contraire à les maintenir associés aux températures élevées.

Il faut enfin rappeler que les membranes très riches en protéines, telle la membrane mitochondriale interne, semblent présenter une faible fluidité.

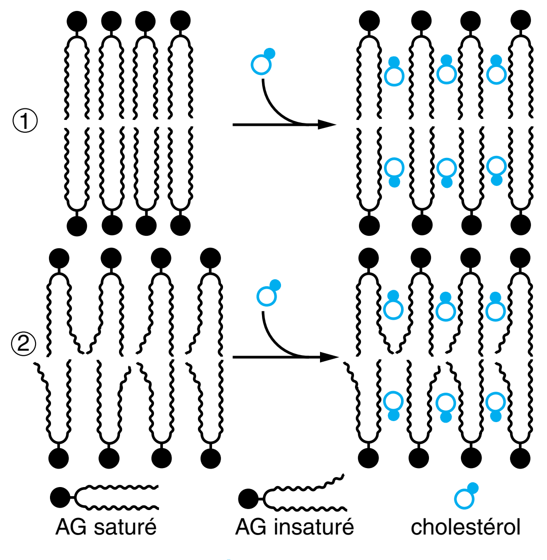


Figure 5.20

Importance du cholestérol dans le contrôle de la fluidité membranaire, en fonction de la composition en lipides de la membrane

(1) Membrane initialement riche en acides gras saturés et visqueuse : augmentation de la fluidité, par une diminution des interactions hydrophobes.
(2) Membrane riche en acides gras insaturés et fluide : diminution de la fluidité par une augmentation de ces interactions.
Un acide gras saturé est représenté par un trait droit, alors qu'un acide gras insaturé est représenté par un trait anguleux, en raison de la présence d'une double liaison.

3.2.4. Régulation de la fluidité membranaire

On a vu que toutes les cellules, y compris les plus simples d'entre elles, les Bactéries, sont capables de réguler et d'adapter la composition lipidique de leurs membranes en fonction des conditions du milieu, afin de maintenir une fluidité optimale (on parle d'**adaptation homéovisqueuse**). Lorsque *Escherichia coli*, dont la température de croissance est normalement de 37 °C, est cultivée à 27 °C, on observe que la quantité relative des chaînes hydrocarbonées insaturées contenues dans ses lipides membranaires augmente significativement ; la fluidité est ainsi conservée. De la même façon, on observe une telle adaptation chez les Animaux poïkilothermes ou les Plantes, qui sont directement soumis aux variations de température du milieu extérieur. Le cas des Animaux supérieurs hibernants est également très remarquable à cet égard.

4. DIVERSITÉ DES FONCTIONS MEMBRANAIRES AU SEIN DES CELLULES

La diversité des structures auxquelles participent les membranes cellulaires, en particulier chez les Eucaryotes, est reflétée par la multiplicité des fonctions qu'elles sont capables d'assurer. Nous présentons ici un rapide classement de ces fonctions, introduisant en fait la plupart des chapitres suivants de cet ouvrage.

4.1. Fonction de « barrière physique » et rôle dans la ségrégation de composés chimiques

Cette fonction de base de toute membrane est évidemment illustrée par la membrane plasmique qui sépare l'intérieur de la cellule du milieu environnant. Ce milieu, parfois exclusivement minéral et de composition simple, n'est en aucun cas comparable au contenu cellulaire. Ce dernier, infiniment complexe par la diversité de ses molécules (plusieurs milliers ou dizaines de milliers d'espèces, pour les cellules les plus simples) et par leur complexité propre, doit pouvoir être préservé, de même que ses constituants ne doivent pas diffuser librement à l'extérieur. La lutte contre l'entropie (c'est-à-dire le maintien de l'« ordre établi »), condition première de la vie, commence avec cette membrane limitante. Nous verrons dans le chapitre suivant les moyens mis en œuvre par les cellules pour que cette fonction nécessaire de barrière physique soit compatible avec les indispensables échanges de matière que celles-ci entretiennent avec ce même milieu.

Au sein des cellules, toutes les membranes remplissent également ce rôle fondamental de **compartimentation physique** ou chimique, mais il est souvent associé à d'autres fonctions qui seront décrites plus loin. Pour quelques organites cependant, ce simple rôle de ségrégation est le seul qui soit évident ; on citera, par exemple, le cas des nombreuses vésicules de tailles très diverses, limitées en général par une seule membrane, et qui emplissent le hyaloplasme de certaines cellules. Elles servent essentiellement à transporter, d'un organite à un autre, des collections de composés chimiques précis (protéines, glycoprotéines, polysaccharides, médiateurs chimiques…), ou bien à

les conserver en l'état, pour des durées parfois très longues (rôle de stockage de réserves ou de produits de sécrétion). Ces vésicules participent à un vaste **flux membranaire** qui trouve son origine dans le réticulum endoplasmique ; tous ces aspects seront traités dans les chapitres 7 (lysosomes) et 9 (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi). D'une certaine manière, la fonction de l'enveloppe nucléaire, dont le rôle est de confiner l'essentiel du matériel génétique des cellules eucaryotiques, entre dans cette catégorie (voir chapitre 8).

4.2. Fonction d'échange de matière

Cette fonction est inséparable de la première, et commune à la plupart des membranes. Les fonctions d'échange de matière les plus évidentes concernent, ici aussi, la membrane cytoplasmique, puisque les cellules sont des systèmes thermodynamiquement ouverts : des ions minéraux, des petites molécules organiques (sucres, acides aminées…), des macromolécules transitent dans les deux sens à travers elle. Des **transporteurs** spécifiques, constitués de protéines transmembranaires, sont mis en jeu dans tous ces échanges qui existent aussi dans des organites tels que les mitochondries, les plastes ou les vacuoles. Les ions interviennent parfois directement, à titre de cofacteur enzymatique, dans les processus enzymatiques et métaboliques au sein du cytoplasme. Leurs mouvements à travers les membranes, comme le montreront de nombreux exemples, sont cependant très souvent associés à des phénomènes plus spécifiquement liés à l'énergétique cellulaire (chapitre 10), ou au transport d'informations à longue distance, sous forme d'impulsions électriques (cas des cellules électriquement excitables).

Les échanges de molécules organiques interviennent, quant à eux, dans les processus de nutrition ou d'élimination des déchets, mais aussi dans le cadre de la construction et du renouvellement de structures extracellulaires (dites **matrices extracellulaires**) dont l'importance est considérable dans l'organogenèse des organismes pluricellulaires. Le franchissement de la membrane plasmique par des macromolécules ou des particules que la cellule ingère met en œuvre le processus d'**endocytose**. Celui-ci nécessite l'intervention de vésicules formées au niveau de la membrane plasmique elle-même, qui sont le plus souvent pourvues de **récepteurs membranaires** ; ces vésicules rencontrent celles, d'origine interne, qui participent au flux membranaire signalé plus haut, et elles fusionnent avec elles (voir chapitre 6).

Nous décrirons enfin un type universel (c'est-à-dire rencontré aussi bien chez les Procaryotes que chez les Eucaryotes) de franchissement des membranes par des protéines naissantes ou dont la synthèse est déjà achevée. Il s'agit du processus d'insertion cotraductionnelle des protéines dans le réticulum endoplasmique rugueux des cellules eucaryotiques et des mécanismes post-traductionnels participant essentiellement à la biogenèse des organites semi-autonomes (mitochondries et plastes, voir chapitre 10). Dans ces deux situations, nous constaterons que les protéines peuvent franchir complètement la membrane (cas des protéines solubles) ou bien lui rester associées et participer à l'accroissement de sa surface, en tant que protéines intrinsèques. Des mécanismes équivalents existent chez les Bactéries.

4.3. Fonction de support d'activités enzymatiques

Probablement toutes les membranes biologiques possèdent des protéines intrinsèques à fonction enzymatique, intervenant dans le métabolisme intermédiaire ou énergétique. On en trouve aussi bien dans la membrane plasmique de toutes les cellules, procaryotiques ou eucaryotiques, que dans celles de l'appareil de Golgi ou des organites semi-autonomes, par exemple, chez ces dernières. La réalisation de **surfaces actives** permet d'augmenter considérablement la vitesse du métabolisme ; en effet, lorsque les diverses enzymes participant à une même voie biochimique sont rapprochées au sein d'une même structure plane, ceci diminue les phénomènes de diffusion des réactifs et facilite l'accès aux sites catalytiques.

Dans un volume ayant la taille approximative d'une cellule eucaryotique moyenne (10 µm de diamètre), on calcule que la probabilité de rencontre d'une molécule de substrat et d'une molécule d'enzyme est multipliée par un facteur allant de 10 à 100 lorsqu'on ajoute à la simple diffusion aléatoire en trois dimensions une composante de diffusion en deux dimensions. De façon générale, les molécules cibles (les enzymes) sont liées à une membrane tandis que les molécules devant les rencontrer (les substrats) sont susceptibles de diffuser à la fois dans l'espace hyaloplasmique et au sein de cette dernière.

Ce type de situation sera analysé en détail dans le cas du fonctionnement du réticulum endoplasmique lisse (chapitre 9). Celui-ci constitue un système enzymatique membranaire spécialisé à la fois dans les réactions de détoxification de composés nuisibles à la cellule, et dans la synthèse de lipides membranaires qui sont incorporés progressivement à la bicouche elle-même. Dans le cas des mitochondries et des plastes, on décrira des systèmes de transporteurs (protéiques ou non) assurant également des transferts latéraux d'électrons d'une molécule à une autre dans le plan d'une membrane spécialisée.

4.4. Fonction de capture et de transformation d'énergie

Grâce à certaines de leurs protéines, divers types de membranes biologiques sont capables de capter une forme d'énergie physique : la lumière, et de la transformer soit en une autre forme d'énergie directement utilisable par la cellule (énergie chimique), soit en un signal induisant une simple réponse informative de la part de la cellule sensible (cellules sensorielles). Dans tous les cas, la capture de l'énergie lumineuse implique la présence de pigments liés aux protéines membranaires. Les niveaux d'énergie mis en jeu dans ces deux processus ne sont évidemment pas identiques, de même que les mécanismes moléculaires permettant d'assurer les phénomènes de transformation ou de transduction nécessairement associés.

Dans le chapitre 10, nous décrirons en détail les mécanismes de la **photosynthèse** chez les Végétaux autotrophes (Algues et Plantes supérieures). Celle-ci y est assurée par les chloroplastes dont les membranes thylakoïdiennes, porteuses de chlorophylle et de divers autres pigments, permettent d'absorber l'énergie lumineuse et de la transformer finalement en un **gradient transmembranaire de protons**, lui-même source d'énergie chimique. Des mécanismes équivalents existent chez les Bactéries photosynthétiques, mais celles-ci présentent en outre des modalités très diverses d'utilisation de la lumière et des substrats fournisseurs d'électrons. La perception de la lumière par des cellules sensibles (cellules visuelles des Animaux, par exemple) est basée sur un tout autre principe qui rejoint en fait celui présenté dans le paragraphe précédent. la membrane plasmique est ici mise en jeu sous la forme de nombreux saccules membranaires empilés et le pigment récepteur est de nature différente (rétinal).

La membrane mitochondriale interne permet de transformer une forme d'énergie chimique (celle contenue dans les molécules organiques réduites) en une autre, directement utilisable dans toutes les activités de la cellule : l'ATP ; c'est la **respiration cellulaire**. Elle utilise pour cela, comme dans le cas des chloroplastes, un « intermédiaire » constitué par un gradient transmembranaire de protons, généré lui-même par une collection de protéines intrinsèques. Cette membrane présente donc beaucoup d'analogies structurales et fonctionnelles avec celle des thylakoïdes des chloroplastes, et toutes les deux sont en fait bâties sur le modèle des membranes bactériennes ayant un rôle équivalent. Nous verrons au chapitre 16 que ces organites eucaryotiques ont eu des « ancêtres bactériens », au cours de l'évolution, ce qui explique une telle ressemblance.

4.5. Fonction de transduction de signaux et de transfert d'information à longue distance

La membrane plasmique de toute cellule contient des protéines intrinsèques remplissant une fonction de détection de signaux variés issus du milieu environnant ; elles appartiennent à la grande familles des **récepteurs membranaires**. Ces molécules ont en commun de posséder un domaine extracellulaire volumineux qui leur sert d'« antenne » capable de reconnaître et de fixer des molécules spécifiques : hormones polypeptidiques, facteurs de croissance, protéines de la matrice extracellulaire, protéines associées à la membrane d'autres cellules… (voir *figure* 5.21). Mais ces protéines ne se contentent pas de fixer ce ligand ; elles « envoient », à cette occasion, une information à travers la membrane, sous la forme d'une modification de leur conformation. Ce processus enclenche une série de réactions en cascade au sein de la cellule, qui se traduisent par un changement plus ou moins profond de l'activité cellulaire, directement au niveau du métabolisme, mais aussi au niveau de l'expression des gènes.

On appelle **transduction d'un signal** l'ensemble des processus qui contribue à la fois au passage d'une information d'origine extracellulaire à travers la membrane (*via* ces récepteurs), et à la réalisation de la réponse physiologique (voir

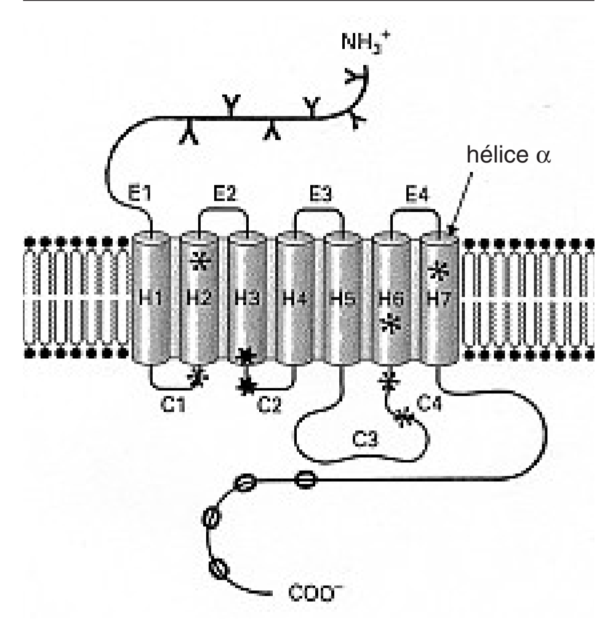


Figure 5.21

Schéma représentant l'organisation en deux dimensions d'un récepteur transmembranaire associé aux protéines G

Ce récepteur dit «à sept passages» est constitué de 7 hélices α transmembranaires (H), de deux gros domaines extra et intracellulaires (respectivement N et C terminaux), de 3 boucles externes (E2, E3 et E4) et de 3 boucles cytoplasmiques (C1, C2 et C3). Le gros domaine extracellulaire fixant le ligand protéique (hormone) est fortement glycosylé (motifs en Y). Diverses mutations altérant la fonction de ce type de récepteur sont indiquées : les 6 motifs en étoile correspondent à des sites mutés entraînant une stimulation constitutive de l'effecteur, tandis que les deux autres motifs correspondent à des mutations empêchant sa stimulation. Les récepteurs mutés des hormones concernées sont les suivants : MSH (C1, H2) ; ACTH (H3) ; Vasopressine (C2) ; TSH (C4) ; LH (H6) ; Rhodopsine (H7) ; voir aussi le chapitre 13. Les quatre ronds dessinés dans le domaine interne représentent des acides aminés pouvant être phosphorylés, dans le cadre de la régulation de l'activité du récepteur. Modifié d'après G. Karp, «Cell and molecular biology», 1996, Wiley ed.

chapitre 13). Au sens large, la transduction est donc la conversion d'un signal d'un type donné en un signal intracellulaire d'un autre type ; ce terme est également utilisé dans le cas des cellules sensorielles qui captent des signaux physiques (lumière, chaleur, mouvement, champ magnétique…) et qui induisent une réponse cellulaire particulière, le plus souvent, chez les Animaux, sous la forme d'un signal électrique. Des exemples existent aussi chez les Bactéries.

Dans le cas des cellules nerveuses, la membrane plasmique des longs prolongements appelés axones possède la propriété remarquable de conduire sur de longues distances une information sous la forme d'un courant électrique transmembranaire localisé ; celui-ci, nommé **potentiel d'action**, se propage depuis le corps cellulaire jusqu'aux extrémités synaptiques (chapitre 6). Cette propriété de la membrane tient à la présence de différentes protéines intrinsèques fonctionnant comme des canaux ioniques spécifiques (des ions K^+ ou Na^+, par exemple). Ces canaux, comme les récepteurs signalés plus haut, sont sensibles à des facteurs externes physiques (la tension électrique) ou des médiateurs chimiques (les neurotransmetteurs, telle l'acétylcholine) qui contrôlent leur fonctionnement. (Voir l'ouvrage de G. Hennen, *Biochimie*).

4.6. Fonction de reconnaissance et d'adhérence entre les cellules

Ce dernier type de fonction ne concerne que les organismes animaux, chez qui les cellules voisines sont souvent amenées à contracter des liens étroits par l'intermédiaire de leurs membranes plasmiques. Au niveau de celles-ci, ils sont en effet les seuls à posséder des dispositifs spécialisés d'ancrage et de communication directe construits à partir de protéines intrinsèques transmembranaires et appelés **jonctions intercellulaires**. Toutes ces structures, qui constituent une condition indispensable à l'établissement de l'état pluricellulaire animal, sont décrites en détail dans le chapitre 14.

Nous verrons à cette occasion que les membranes des cellules appartenant à un même tissu animal sont également porteuses de nombreuses protéines assurant entre elles une reconnaissance spécifique, sans que des structures particulières soient différenciées et cytologiquement visibles. Enfin, divers types de cellules entrent en contact, par l'intermédiaire de protéines de leur membrane plasmique, avec des constituants chimiques variés remplissant les espaces intercellulaires. Ces derniers, qui sont particulièrement développés dans le cas du tissu conjonctif, par exemple, sont remplis en effet d'une **matrice extracellulaire** (produit de la sécrétion des cellules elles-mêmes) dont les fonctions multiples seront également décrites dans le chapitre 14.

PERSPECTIVE BIOMÉDICALE

L'utilisation thérapeutique des liposomes

Lorsque des médicaments, qui sont souvent des substances nocives pour les cellules saines de notre organisme, sont injectés dans la circulation sanguine, ils sont dilués, absorbés par les cellules malades mais aussi par les saines, parfois dégradés et excrétés. Finalement, une faible quantité de substance active atteint sa cible ; il est donc nécessaire d'injecter des quantités importantes de médicament pour obtenir un effet thérapeutique, avec un risque d'intoxication et d'effets secondaires majeurs.

Les liposomes unilamellaires permettent d'intégrer (dans leur lumière) des médicaments hydrosolubles, lorsque ces derniers sont dissous dans le tampon qui a servi à leur fabrication. De même, des substances liposolubles peuvent se trouver incorporées dans leurs membranes (cas des liposomes multilamellaires). Les médicaments ainsi administrés sont donc isolés du sang, ne sont pas dilués, et s'ils atteignent les cellules malades, ils y seront délivrés en concentration élevée. Le ciblage spécifique des liposomes vers les cellules malades est donc une question capitale. De nombreuses expériences ont déjà montré la faible toxicité et la grande efficacité de ces traitements.

Les possibilités d'interaction des liposomes avec les cellules sont multiples. Il peut s'agir d'une adsorption sur la membrane plasmique, ce qui tend à favoriser la diffusion du composé stocké vers la cellule, par simple rapproche-ment. Si la fusion du liposome avec la membrane cellulaire a lieu, celle-ci conduit direc-tement au déversement de son contenu dans le cytoplasme. On peut aussi envisager une endocytose des liposomes, suivie de leur dégra-dation dans les lysosomes et de la libération éventuelle des molécules dans le cytosol.

Après injection, on observe en fait que la majorité des liposomes circulants est rapidement phagocytée par les macrophages présents dans le système réticulo-endothélial (ganglions lymphatiques, foie, rate, poumons), ce qui peut évidemment les empêcher d'atteindre leur cible.

En revanche, lorsque ce sont ces mêmes cellules qui font l'objet d'une infection bactérienne ou parasitaire, les liposomes constituent des outils très performants. Les doses d'antibiotiques permettant de lutter efficacement contre la brucellose, la listériose ou la salmonellose sont divisées par un facteur 100, quand on les administre via des liposomes. Il en va de même pour combattre la leishmaniose (une maladie parasitaire très répandue).

D'autres affections ont été soignées avec succès grâce à des médicaments encapsulés : la pyélonéphrite (une maladie infectieuse des reins), des mycoses graves, fréquentes chez les sujets immunodéprimés (cas de SIDA, cancers soignés par chimiothérapie), ainsi que certaines tumeurs solides ou des leucémies. L'usage des liposomes comme vecteurs d'ADN pour soigner les maladies génétiques suscite enfin de nombreux espoirs.

Un exemple bien connu est celui du traitement de la mucoviscidose. Le gène normal codant la protéine CFTR (un canal chlore ; voir l'encart sur ce sujet) est inclus dans des liposomes qui sont délivrés au patient grâce à un aérosol. La membrane des liposomes fusionne avec celle des cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures ; le gène normal peut alors corriger temporairement la déficience génétique de la cellule. En raison de leur moins grande capacité à provoquer une réponse immunitaire à la suite de traitements répétés, les liposomes représentent un grand avantage sur la technique utilisant les adénovirus comme vecteurs d'ADN. Leur efficacité reste cependant inférieure, car la quantité d'ADN transférée aux cellules est bien moindre qu'avec les virus.

Les voies d'approche actuelles du ciblage des liposomes se dirigent vers leur association à des protéines membranaires, telles que : anticorps, glycoprotéines, hormones ou facteurs de croissance, qui seraient reconnus par des récepteurs de surface spécifiques des cellules visées par le traitement.

RÉSUMÉ

On sait depuis longtemps que les membranes biologiques contiennent une phase lipidique constituée d'un nombre relativement limité de phospholipides, de glycolipides, et dans le cas des cellules animales, de cholestérol. La composante protéique des membranes est, quant à elle, responsable de la grande diversité structurale et de la spécificité fonctionnelle des membranes rencontrées aussi bien chez les Eucaryotes que chez les Procaryotes. Les glucides, que l'on trouve toujours associés en quantités variables aux membranes sont en fait portés par les lipides ou les protéines (glycolipides et glycoprotéines).

L'architecture moléculaire des membranes a été analysée au moyen de systèmes modèles simplifiés résultant de l'autoassemblage *in vitro* des phospholipides : micelles, monocouches, bicouches et liposomes. Les approches de la microscopie électronique classique en transmission, puis par cryofracture et cryodécapage, ont conduit à l'élaboration du modèle d'organisation dit « en mosaïque », dans lequel les protéines sont enchâssées dans une bicouche lipidique. Des techniques d'étude biochimique spécifiques des protéines membranaires, utilisant en particulier des détergents, permettent de comprendre comment celles-ci peuvent se maintenir de façon stable au sein d'un contexte hydrophobe.

Toutes les membranes biologiques sont caractérisées par une asymétrie de structure liée aussi bien à la composition en lipides des deux monocouches qu'à la disposition orientée et inamovible des protéines qui les constituent. Cette asymétrie est liée à l'origine profonde des membranes au sein de la cellule ainsi qu'à l'existence de mécanismes actifs de basculement des phospholipides d'une monocouche dans l'autre.

La mobilité latérale est une autre propriété majeure des membranes biologiques ; elle concerne les lipides et les protéines, qui peuvent souvent se déplacer sans contrainte dans le plan de la bicouche. Cette fluidité est influencée par des facteurs physiques, comme la température, ou biochimiques, en particulier la composition en acides gras des lipides de la bicouche et la richesse en cholestérol.

Au sein des cellules eucaryotiques, les multiples membranes remplissent des fonctions très diverses : outre un rôle fondamental de barrière physique intervenant dans la ségrégation de composés chimiques, elles doivent assurer le passage sélectif, dans un sens ou dant l'autre, de composés minéraux, organiques ou même de particules de grande taille. Diverses catégories de transporteurs protéiques transmembranaires, actifs ou passifs, effectuent ces transferts. Grâce à d'autres protéines fonctionnant comme des récepteurs, les cellules perçoivent à travers leurs membranes des signaux extérieurs, qu'elles sont capables de traduire en une réponse physiologique adaptée.

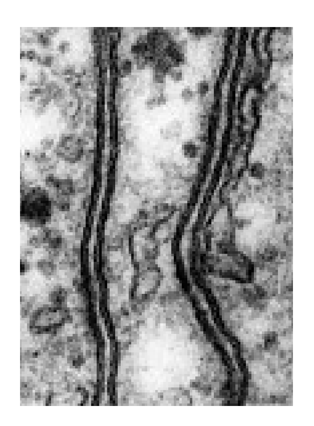
Les membranes peuvent aussi servir de support à de nombreuses activités catalytiques dont l'efficacité est grandement améliorée par cette disposition. Dans un même ordre d'idées, certaines structures membranaires des cellules photoautotrophes (thylakoïdes bactériens ou des chloroplastes) sont capables de capter l'énergie lumineuse et de participer, selon un mécanisme très original (impliquant un gradient ionique), à sa transformation en énergie chimique. C'est un mécanisme voisin qui intervient, au niveau des membranes mitochondriales internes, dans la synthèse de l'ATP.

Enfin, chez les animaux, la reconnaissance et l'accrochage entre les cellules au sein des tissus et des organes impliquent des molécules ou des dispositifs associés à leur membrane plasmique.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Quelles sont les molécules constitutives d'un glycérophospholipide ? comment celui-ci est-il organisé ?
2. Quelles molécules élémentaires constituent la molécule de céramide ?
3. Citez les principales catégories de glycolipides et donner leurs propriétés physicochimiques.
4. En quoi le cholestérol se distingue-t-il fondamentalement des autres composés lipidiques rencontrés dans les membranes des cellules animales ?
5. Pourquoi dit-on que les lipides membranaires sont des composés amphiphiles ? quelle est la conséquence majeure de cette propriété ?
6. Qu'appelle-t-on « liposomes » ? en quoi se distinguent-ils des micelles ? et quel est leur intérêt en recherche fondamentale ou appliquée ?
7. Dans quelles conditions expérimentales observe-t-on la structure trilaminaire caractéristique des membranes biologiques ? que représente-t-elle au plan biochimique ?
8. En quoi consiste le protocole dit « de cryofracture et cryodécapage » ? quel est son intérêt majeur pour l'étude des membranes ?
9. Qu'appelle-t-on « protéine intrinsèque » et « protéine extrinsèque » dans les membranes biologiques ? comment les distingue-t-on techniquement ?
10. Décrire un protocole (utilisant les hématies des Mammifères) permettant d'identifier les domaines hydrophiles extracellulaires et cytosoliques des protéines de la membrane plasmique.
11. Qu'est-ce qu'un détergent ? Citer deux détergents très connus. En quoi ces molécules sont-elles utiles pour l'étude des membranes ?
12. Que nous apprend le profil d'hydrophobicité déterminé à partir de l'étude de la structure primaire d'une protéine membranaire ?
13. Qu'appelle-t-on « protéine à traversée unique » et « protéine à traversées multiples » ?
14. En quoi les lipides et les glucides membranaires participent-ils à l'asymétrie structurale (transversale) des membranes ?
15. Sur quelle face membranaire sont localisés les résidus glucidiques des glycoprotéines et des glycolipides : 1) au niveau de la membrane plasmique, et 2) au niveau du réseau endomem-branaire ?
16. Qu'appelle-t-on « diffusion transversale facilitée », dans le cas des membranes dites biogéniques, et « diffusion active » dans celui des membranes non biogéniques ?
17. En quoi consiste le phénomène de diffusion latérale des lipides et des protéines ? quelles principales expériences permettent de le décrire ?
18. Quels sont les facteurs physicochimiques majeurs influençant la fluidité des membranes ?
19. Quels sont les effets du cholestérol sur la fluidité des membranes, et pour quelles raisons physicochimiques ?
20. Citer les principales fonctions associées aux divers types de membranes rencontrés dans les cellules eucaryotiques.



Chapitre 6

ÉCHANGES DE MATIÈRE ENTRE CELLULE ET MILIEU EXTÉRIEUR
Le rôle de la membrane plasmique

La première fonction de la membrane cytoplasmique (ou plasmique) est de permettre la compartimentation fondamentale, au niveau de la cellule, en ce sens qu'elle joue le rôle d'une frontière physique entre les milieux intra- et extracellulaire, et qu'elle maintient des propriétés différentes dans chacun d'eux. En raison de son caractère hydrophobe, elle s'oppose en effet à la libre diffusion des ions et des solutés hydrophiles, de même qu'à celle de la plupart des macromolécules biologiques. Ceci semble en contradiction avec une seconde fonction que doit exercer cette membrane, à savoir assurer de nombreux échanges.

Le fonctionnement cellulaire implique en effet une importation continue de matières premières (ou de combustibles) et une exportation des produits ou déchets du métabolisme (voir chapitre 1). Par ailleurs, la plupart des activités biologiques ne s'exercent que si les concentrations intracellulaires de nombreux composés sont suffisamment élevées. C'est le cas des substrats de toutes les enzymes et de certains ions, tels les ions K^+, qui sont en général présents dans le milieu extérieur en faible concentration. À l'inverse, la concentration d'autres ions doit être maintenue à un niveau très bas, malgré une concentration extracellulaire élevée ; on peut citer l'exemple des ions Ca^{2+} libres, qui ont un rôle capital de « messager secondaire ».

La nécessité du contrôle strict des flux d'eau, d'ions ou de molécules, au niveau de la membrane plasmique, est apparue très rapidement aux biologistes cellulaires. La notion de perméabilité sélective avait été clairement dégagée, bien avant que soient connus la structure intime des membranes biologiques et les mécanismes précis des échanges. Pour transporter efficacement tous les composants du milieu indispensables à la vie, les cellules possèdent des systèmes spécifiques constitués de protéines transmembranaires spécialisées. Celles-ci sont chargées du transfert d'un ion, d'une molécule ou d'un groupe particulier de petites molécules apparentées. Par ailleurs, les cellules ont aussi acquis la capacité (au moins chez les Eucaryotes) à ingérer des macromolécules ou même des particules de grande taille, mais selon un mécanisme totalement différent : l'endocytose.

1. ORGANISATION ET PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DE LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

1.1. Asymétrie structurale marquée de la membrane cytoplasmique. Notion de glycocalyx

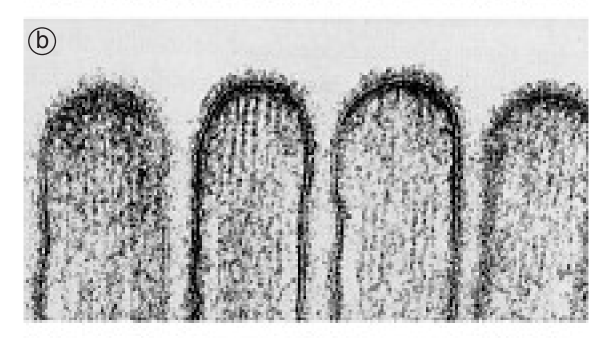
En microscopie électronique, la membrane cytoplasmique présente en général la structure trilaminaire classique. Cependant, dans le cas d'un certain nombre de cellules animales (entérocytes, cellules à mucus ou cellules endothéliales, par exemple) ou de Protistes (Amibes), les coupes montrent que la face externe de cette membrane est recouverte d'un revêtement fibreux ayant une épaisseur de 50 à 200 nm ; les fibres, dont le diamètre est de 1 à 2 nm, sont implantées perpendiculairement à la membrane et forment un tapis serré

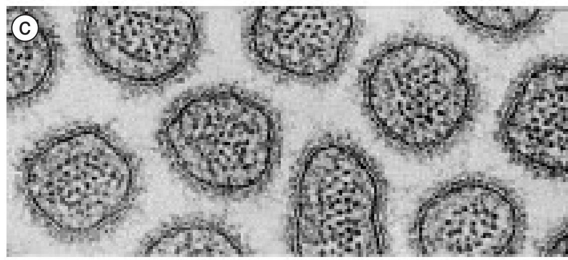
et continu (voir *figure* 6.1). Ce revêtement est nommé **manteau cellulaire** ou *cell-coat*, ou bien **glycocalyx** (enveloppe de sucres). Les techniques de la cytochimie en microscopie photonique ou électronique, telles que la méthode de l'APS (voir chapitre 7) ou les lectines marquées, ainsi que certaines colorations spécifiques (rouge de ruthénium), démontrent que le glycocalyx est très riche en polysaccharides.

Dans les tissus animaux massifs, le glycocalyx constitue le «ciment» remplissant l'espace de 10 à 20 nm qui est toujours présent entre deux cellules. Chez les Amibes, il forme une enveloppe protectrice épaisse mais souple, qui suit les mouvements de la cellule : l'enveloppe muqueuse. Le glycocalyx recouvrant les microvillosités de la face apicale des entérocytes (bordure en brosse) constitue une structure lâche et poreuse, facilement traversée par l'eau, les ions et les petites molécules.

Les polysaccharides du manteau sont en général liés de façon covalente à des protéines ou à des lipides membranaires (glycoprotéines et glycolipides). Dans le cas des glycocalyx épais (cas des entérocytes, par exemple), on sait que des protéines fortement glycosylées, nommées **protéoglycanes** ou **mucoprotéines**, ne sont pas directement accrochées à la membrane, mais associées aux molécules précédentes par des liaisons faibles. On passe ainsi insensiblement de la notion stricte de glycocalyx à celle de **matrice extracellulaire**, qui rassemble les productions sécrétées : protéines ou polysaccharides (voir le chapitre 14).

a





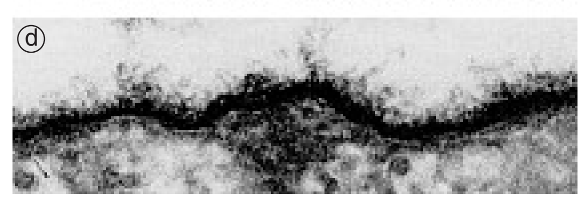


Figure 6.1

Coupes de microscopie électronique montrant quelques exemples de revêtements polysaccharidiques ou glycocalyx, présents à la surface de divers types de cellules

(a) Cellules endothéliales, avec un fin feutrage extracellulaire. **(b)** et **(c)** Microvillosités de la face absorbante des entérocytes (coupes longitudinale et transversale), présentant un feutrage dense et épais. **(d)** Surface d'un lymphocyte colorée au rouge de ruthénium.
Grossissement × 120 000. (Clichés Labo BC4, Orsay).

1.2. Mise en évidence expérimentale de l'asymétrie biochimique et de la fluidité de la membrane cytoplasmique

Ces questions ayant déjà été largement évoquées dans le chapitre précédent, nous nous contenterons de décrire ici quelques exemples d'expériences classiques appliquées à l'analyse des membranes cytoplasmiques.

1.2.1. Asymétrie membranaire

L'analyse chimique globale des fantômes d'hématies de Mammifères montre que quatre phospholipides majeurs (60 % du total) entrent dans la constitution de la bicouche : la phosphatidyl-choline, la phosphatidyl-sérine, la phosphatidyl-éthanolamine et la sphingomyéline. Nous avons vu que ces quatre espèces moléculaires sont réparties de façon asymétrique par rapport aux deux faces de la membrane. Quelles expériences

ont permis d'obtenir un tel résultat ? On connaît des réactifs qui ne franchissent pas les bicouches et qui se fixent spécifiquement sur certains groupements chimiques des lipides, ou bien les détruisent ; ceci permet donc de marquer et/ou repérer exclusivement ceux qui sont exposés sur la face externe de la membrane plasmique.

Si l'on incube, par exemple, des hématies dans le composé nommé FMMP (formyl méthiolnyl sulfone méthyl-phosphate, spécifique des fonctions -NH_2), on observe, après purification des lipides membranaires, que la phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanolamine, qui devraient normalement réagir avec lui, ne sont pas marquées. En revanche, si la membrane plasmique est rendue perméable au réactif grâce à un détergent, on constate que ces deux lipides sont marqués ; ceci démontre clairement qu'ils sont localisés dans la couche interne de la bicouche. Par ailleurs, si on incube des hématies en présence de **phospholipases**, enzymes qui attaquent uniquement les phospholipides accessibles de l'extérieur (les protéines ne franchissant pas spontanément les membranes), la phosphatidyl-choline et la sphingomyéline sont presque totalement dégradées, ce qui indique leur présence quasi exclusive dans la couche externe de la membrane (voir chapitre 5). Cette asymétrie de la composition des membranes due aux lipides a été retrouvée dans les membranes plasmiques de très nombreux types cellulaires.

La question de l'asymétrie membranaire due aux protéines a été traitée dans le chapitre 5. On peut ajouter que la topologie des protéines est aussi étudiée à l'aide d'anticorps anti-peptides, utilisés sur des cellules perméabilisées ou non ; cette méthode suppose que la séquence des protéines soit connue. Nous rappelons enfin l'existence de la technique permettant d'obtenir des vésicules retournées à partir des membranes d'hématies humaines. La mise en place initiale de cette double polarité biochimique de la membrane cytoplasmique sera traitée dans le chapitre 9.

1.2.2. Fluidité membranaire

La diffusion latérale des protéines dans la membrane plasmique a été démontrée *in vivo*, de façon très élégante, dès le début des années 70, sur un système biologique original qui mérite une description détaillée. On rappelle que c'est ce type d'expériences qui a conduit à la notion désormais classique de « mosaïque fluide ».

La possibilité de réaliser *in vitro* des **hétérocaryons**, à partir de cellules humaines et de cellules de souris en culture (voir chapitre 3), a constitué un outil idéal pour démontrer, par immunofluorescence, la diffusion latérale des protéines de la surface cellulaire (voir *figure* 6.2). Après purification des protéines des membranes plasmiques des deux types cellulaires, des anticorps spécifiques sont fabriqués contre elles. Les anticorps anti-protéines humaines sont marqués par la rhodamine et ceux dirigés contre les protéines de souris le sont par la fluorescéine. Ces deux fluorochromes ont été choisis car ils émettent une lumière différente (respectivement rouge et verte) lorsqu'on les excite avec deux longueurs d'onde appropriées. Dès que les hétérocaryons sont obtenus ($t = 0$), on introduit dans le milieu de culture un mélange des deux anticorps marqués et on observe leur distribution sur ces cellules, grâce à la fluorescence qu'ils émettent (voir chapitre 3). Au temps 0, les deux anticorps sont situés chacun sur une moitié de l'hétérocaryon, correspondant visiblement aux deux cellules ayant fusionné. À mesure que le temps passe, on constate que la fluorescence rouge envahit progressivement la moitié « souris » de l'hétérocaryon, et réciproquement pour la fluorescence verte. Au bout de 40 minutes, les deux couleurs (et donc les anticorps) sont complètement mélangées, indiquant que leurs supports physiques, c'est-à-dire les protéines de surface, se sont aussi mélangés. La vitesse du processus est élevée, et donc la fluidité importante, puisque les protéines se sont déplacées de plusieurs dizaines de µm pendant le temps de l'expérience.

2. PERMÉABILITÉ MEMBRANAIRE. TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES

2.1. Généralités. Mécanisme de la diffusion

Les mouvements d'ions ou de molécules à travers les membranes, chez les êtres vivants, sont régis par des mécanismes spécifiques, mais ils obéissent d'abord, bien évidemment, aux lois fondamentales de la physique. La première d'entre elles est celle de la **diffusion**, qu'il faudra prendre

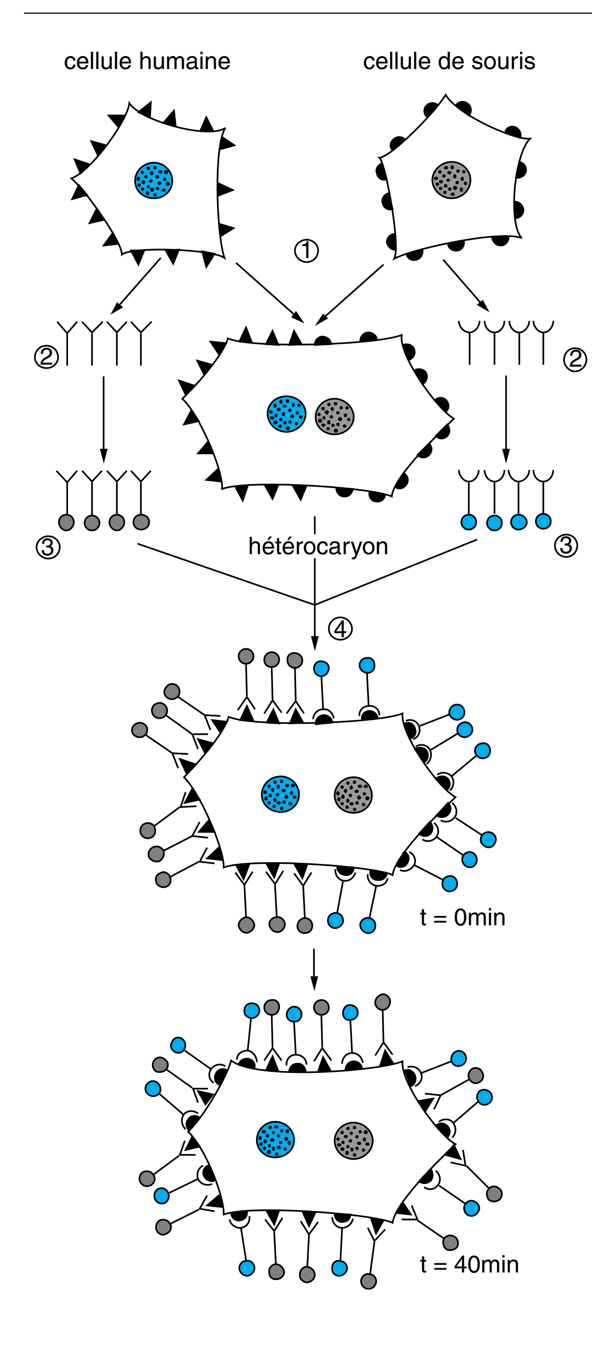


Figure 6.2

Principe d'une expérience de fusion (hétérocaryon « Homme/souris ») démontrant la fluidité de la membrane cytoplasmique

Les protéines propres à chaque moitié de la cellule-chimère, initialement bien distinctes, se mélangent progressivement tout au long de l'expérience, comme en témoigne l'évolution des fluorescences grise et rouge. **(1)** Fusion des cellules grâce à un Virus dit « fusionnant » (Virus Sendaï). **(2)** Obtention des anticorps spécifiques des protéines de chaque type de membrane. **(3)** Marquage des deux catégories d'anticorps. **(4)** Incubation de l'hétérocaryon dans le mélange d'anticorps.

en considération dans tous les mécanismes de transport qui seront décrits. Ce phénomène physique concerne les gaz et les substances dissoutes dans un liquide : les molécules de gaz ou de soluté présentent une certaine agitation spontanée, liée à l'agitation thermique générale, qui provoque leur déplacement désordonné sur place (mouvement brownien). Ceci tient au fait qu'elles sont continuellement soumises à des collisions avec d'autres molécules de gaz, de solvant ou de soluté.

Cette agitation désordonnée est à l'origine d'un flux spontané net de substance sans qu'aucune source d'énergie, autre que la chaleur, soit mise en œuvre. Si l'on considère le cas d'un liquide au sein duquel on distingue deux « points » contenant un même soluté, mais à des concentrations différentes, il y aura diffusion à partir de ces deux points. Le phénomène sera plus intense à partir du point où la concentration est au départ la plus élevée, mais les deux participeront au phénomène, et tout plan virtuel situé entre eux sera traversé par des molécules allant dans les deux sens. Ce système tend inéluctablement vers une homogénéisation complète, ce qui illustre le phénomène d'augmentation d'entropie, qui est la loi générale dans l'Univers.

COMMENTAIRE

La loi de diffusion, ou loi de Fick

La loi liant l'intensité d'un flux net, dû à la diffusion, à divers paramètres a été établie empiriquement par Fick dès 1855. On appelle **flux net** la résultante d'un flux dans un sens diminué du flux dirigé dans l'autre sens, puisque toute molécule, en un endroit donné, se dirige aléatoirement dans n'importe quelle direction. Si les deux points évoqués plus haut sont à une distance x l'un de l'autre, et si les deux concentrations en soluté en ces points sont C_1 et C_2 (avec $C_2 > C_1$, par exemple), le rapport $C_2\text{-}C_1/x$ (soit $\Delta C/x$) mesure l'intensité du gradient de concentration. Pour un ΔC donné, le gradient est d'autant plus fort que x est petit. Les concentrations C sont mesurées en mol. m^{-3} et x en m. Soit un plan situé à mi-chemin entre les points, le flux net traversant une surface S de ce plan est donné par la formule :

$$\text{Flux} = D \times S \times \Delta C/x$$

où D est un **coefficient de diffusion** qui dépend du solvant et du soluté ; on montre

aisément que ses dimensions sont des $m^2.s^{-1}$. Le flux est mesuré en $mol.s^{-1}$.

Ces mouvements dus à la diffusion sont fonction de la température ou de la pression ; ils permettent le déplacement des petites molécules à des vitesses élevées à l'échelle des cellules. On calcule que des molécules de la taille de l'ATP ou du saccharose, par exemple, ont besoin de 0,2 seconde seulement pour parcourir dans l'eau une distance d'environ 10 µm (le rayon d'une cellule animale). Si les petites molécules ou les ions diffusent dans le cytoplasme cellulaire presque aussi vite que dans l'eau pure, il n'en va pas de même pour les macromolécules : les forces de friction que les autres macromolécules ou les structures intracellulaires (très denses) exercent sur elles ralentissent considérablement leur mouvement de diffusion.

Le système envisagé jusqu'ici est le plus simple, car il n'existe pas de barrière physique au mouvement des ions ou des molécules. Lorsqu'on s'intéresse au franchissement d'une membrane, biologique ou pas, l'analyse est plus compliquée : l'épaisseur de la membrane est généralement mal connue, et on ignore comment se passent les événements dans son épaisseur. La diffusion en son sein étant beaucoup plus lente que dans les deux compartiments délimités, on peut admettre qu'une homogénéisation rapide s'établit dans chacun d'eux (qui est donc caractérisé à tout instant par une concentration donnée). Dans ces conditions, la valeur x définie plus haut représente l'épaisseur de la membrane, au sein de laquelle le gradient de concentration dû à ΔC s'établit. On associe habituellement le coefficient D au facteur $1/x$ pour définir un nouveau coefficient, caractéristique du mélange « solvant + soluté » et de la membrane elle-même, qui a comme dimensions des $m.s^{-1}$; on parle alors de **coefficient de perméabilité**, ou **coefficient P** (équivalent à une vitesse). Quelques exemples de valeurs caractéristiques de P pour les bicouches lipidiques artificielles sont donnés plus loin ; ces valeurs vont de 10^{-1} à 10^{-13} $cm.s^{-1}$, en fonction des composés étudiés. La valeur du flux net entre deux compartiments est calculée en multipliant la différence de concentration qui existe entre eux (en $mol.m^{-3}$) par le coefficient P ($m.s^{-1}$) ; on obtient bien une valeur exprimée en moles par m^2 et par seconde.

2.2. Données anciennes relatives à la perméabilité à l'eau et aux substances non électrolytes

Peu de temps après les premiers travaux sur les échanges d'eau à travers des membranes hémiperméables artificielles, effectués par Traube en 1867, il fut montré par Pfeffer et Dutrochet que les lois de l'**osmose** s'appliquaient correctement aux cellules vivantes. Les premiers résultats concernant les substances dissoutes non électrolytes (non ionisées) datent d'un siècle environ (Overton, 1902). Cet auteur utilisait comme matériel une Algue d'eau douce possédant des cellules géantes : *Chara*, dont le contenu vacuolaire pouvait être analysé précisément avec les techniques disponibles à cette époque ; grâce à ce matériel de choix, il a établi une corrélation entre une vitesse de pénétration à travers la membrane cytoplasmique et une caractéristique chimique des molécules dissoutes.

Le *tableau* 6.1 montre qu'il existe, pour une gamme de composés dont les masses moléculaires vont seulement de 59 à 342 Da, des variations considérables de perméabilité. La masse moléculaire n'est visiblement pas le facteur important ; il existe par contre une corrélation nette entre le degré de liposolubilité des composés (traduit ici par le coefficient de partition huile/eau) et leur vitesse de pénétration dans les cellules. Overton avait ainsi observé que, de façon paradoxale, des substances comme les éthers ou les cétones, qui sont des solvants des lipides, franchissent plus rapidement la membrane cytoplasmique que le glycérol ou le saccharose. Or, ces derniers, très solubles dans l'eau, jouent un rôle physiologique au sein des cellules, contrairement aux premiers. Cet auteur avait donc émis une théorie selon laquelle la membrane plasmique était essentiellement de nature « lipoïdique », et prévu que le mécanisme de base de toute pénétration était la diffusion.

De même, comme le montre le diagramme de la *figure* 6.3 (Collander, 1933), qui confirme et complète les données précédentes en y introduisant un facteur « taille des molécules », un certain nombre de composés tels que le méthanol ou l'éthylène-glycol, mais aussi l'eau, traversent les membranes de façon « anormalement » rapide, compte tenu de leur faible liposolubilité. Cette remarque a donc conduit certains auteurs à suggérer que la membrane plasmique devait être considérée comme une mosaïque de régions lipidiques

Substance analysée (MM)		Coefficient de perméabilité (× 10^5 cm.sec^{-1})	Coefficient de partition huile/eau (10^{-2})
Triméthyl citrate	(234)	6,7	4,7
Propionamide	(73)	3,6	0,36
Glycol	(62)	1,2	0,049
Méthylurée	(74)	0,19	0,044
Glycérol	(92)	0,021	0,007
Malonamide	(102)	0,0039	0,008
Saccharose	(342)	0,0008	0,003

Tableau 6.1

Coefficients de perméabilité de quelques composés organiques vis-à-vis de la membrane plasmique d'une Algue à cellules géantes (*Chara*), en rapport avec leur coefficient de partition entre l'huile et l'eau

Pour chaque substance sont indiqués : la masse moléculaire (MM) ; le coefficient de perméabilité ; le coefficient de partition huile/eau (une valeur exprimant le degré de liposolubilité du composé étudié). (D'après Overton, 1902)

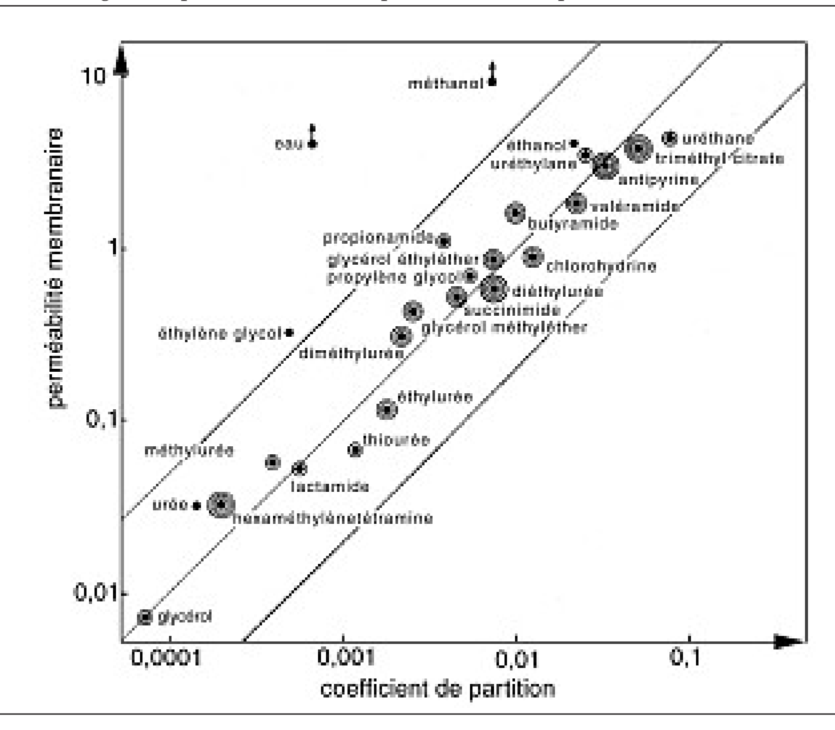


Figure 6.3

Diagramme illustrant la différence de perméabilité de la membrane cytoplasmique d'une Algue unicellulaire géante, vis-à-vis de plusieurs composés organiques, en fonction de leur liposolubilité et de leur masse moléculaire

Abscisses : coefficient de partition huile/eau. Ordonnées : perméabilité, affectée d'un coefficient $\sqrt{M}$, pour tenir compte de la taille (M) de la molécule. Le diamètre du point est proportionnel à cette dernière. (D'après les données de Collander, 1933)

et de régions hydrophiles, permettant une communication entre les phases aqueuses situées de part et d'autre. En l'absence de toute connaissance de l'architecture des membranes, ces premiers auteurs avaient ainsi pressenti l'existence des deux constituants majeurs des membranes biologiques, à savoir la bicouche lipidique et les protéines associées.

2.3. Transports à travers les bicouches artificielles

La connaissance de la nature phospho(glyco)-lipidique du composant dit «lipoïdique» des membranes et celle de l'organisation de ces molécules en une bicouche stable a conduit à l'élaboration relativement récente de modèles expérimentaux permettant d'étudier la perméabilité de membranes artificielles. On utilise à cet effet des **liposomes** (voir chapitre 5), ou des **films noirs** (ou membranes noires) qui se forment au niveau d'orifices pratiqués dans une cloison séparant deux compartiments aqueux contenant des phospholipides en suspension, tels que la phosphatidyl-choline. Ce dispositif permet de distinguer aisément ce qui relève de la perméation par diffusion à travers la seule phase lipidique d'une membrane de ce qui est dû à un quelconque composant hydrophile transmembranaire (voir *figure* 6.4).

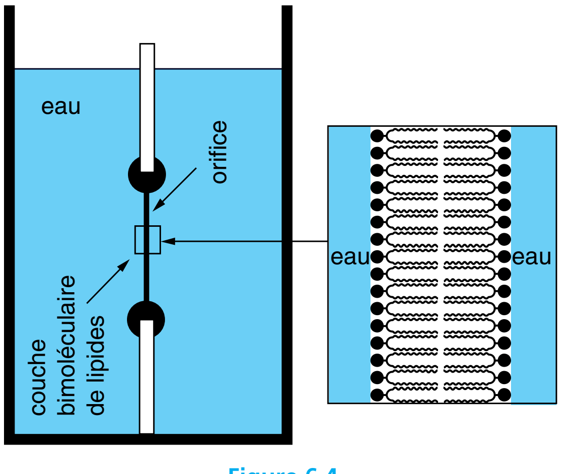


Figure 6.4

Réalisation d'une « membrane noire » phospholipidique au niveau d'un petit orifice séparant deux compartiments aqueux

Ce dispositif permet d'analyser la perméabilité de bicouches artificielles de composition connue, en introduisant un composé dans un compartiment, puis en détectant sa présence dans le second.

Les valeurs des coefficients de perméabilité pour la diffusion de diverses molécules et ions sont données dans la *figure* 6.5 ; les principaux résultats sont les suivants :

– pratiquement toutes les molécules organiques sont susceptibles de diffuser à travers les bicouches lipidiques, mais avec des vitesses très variables. Seules les molécules électriquement chargées sont presque absolument exclues du processus : leur coefficient P est inférieur à 10^{-10} cm.s^{-1} ;

– les bicouches lipidiques sont totalement imperméables aux ions minéraux, malgré leur taille minuscule (coefficient P inférieur à 10^{-12} cm.s^{-1}) ;

– deux paramètres importants sont mis en évidence pour les composés qui diffusent significativement : l'hydrophobicité et la taille des molécules.

Quelques règles de base relatives à la diffusion à travers les bicouches lipidiques peuvent donc être énoncées :

– plus une molécule est petite et hydrophobe, plus elle diffuse rapidement ;

– pour les molécules polaires non chargées, seules celles de petite taille diffusent avec une vitesse significative. Les plus grosses d'entre elles, même biologiquement importantes, sont pratiquement exclues ;

– l'eau, de façon assez étonnante, traverse aisément les bicouches (voir plus loin) ; son coefficient P est voisin de 10^{-3} cm.s^{-1}.

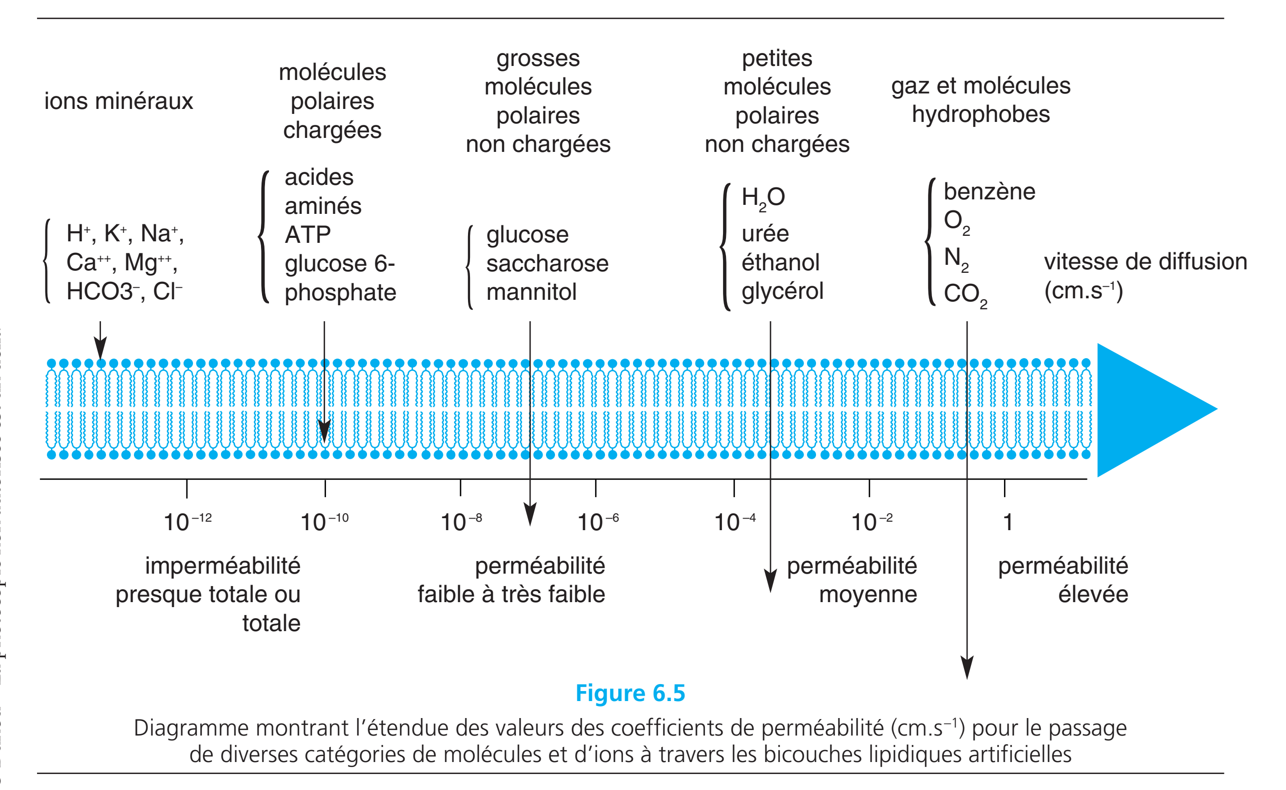


Figure 6.5

Diagramme montrant l'étendue des valeurs des coefficients de perméabilité (cm.s^{-1}) pour le passage de diverses catégories de molécules et d'ions à travers les bicouches lipidiques artificielles

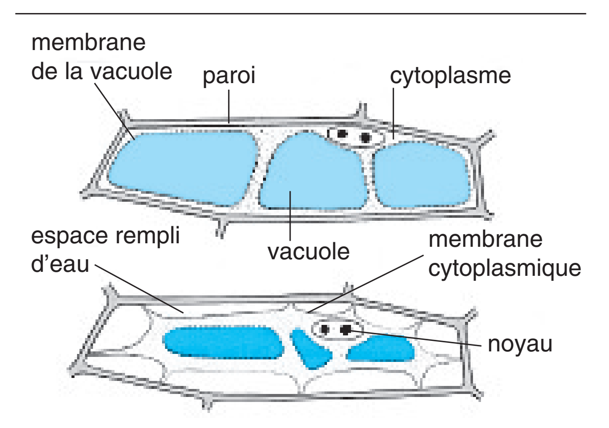
Ces résultats confirment globalement ceux de Overton et Collander, et soulignent le fait que la perméation rapide de composés hydrophiles de grande taille (les sucres, par exemple) doit impliquer des mécanismes autres que la simple diffusion.

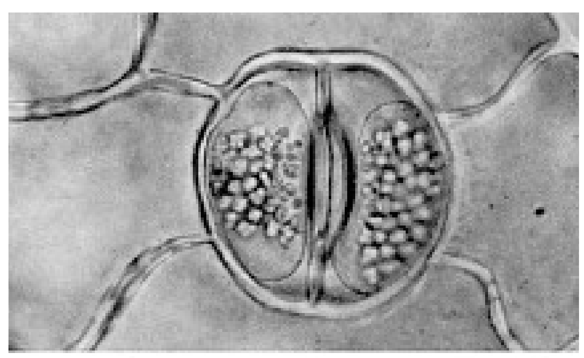
2.4. Transport de l'eau à travers la membrane cytoplasmique

La possibilité d'échanges d'eau à travers la membrane cytoplasmique, ou phénomène d'**osmose**, est facilement démontrée grâce aux expériences classiques suivantes.

• Mises dans une solution saline (NaCl, pH 7,4), des hématies de Mammifère ne conservent leur taille et leur forme que si elles sont en présence d'une **concentration** bien précise, dite **isotonique** (0,9 %). Pour une concentration inférieure (solution **hypotonique**), les hématies gonflent et absorbent de l'eau ; c'est la **turgescence**, qui se termine par l'**hémolyse** et la fuite de l'hémoglobine (voir chapitre 5). Pour une concentration supérieure, le mouvement de l'eau est inverse et les hématies se recroquevillent, car leur volume hyaloplasmique diminue (elles prennent un aspect crénelé typique) ; la solution environnante est qualifiée d'**hypertonique**, et on dit que la cellule est **plasmolysée**. Le mouvement de l'eau à travers la membrane se fait du milieu le plus dilué en substances dissoutes vers le milieu le plus concentré. La loi de l'osmose n'est qu'une simple application de la loi générale de la diffusion appliquée à l'eau : son mouvement se fait du lieu où elle est elle-même la plus concentrée vers celui où elle est la plus diluée.

• Un phénomène semblable est aisément mis en évidence dans des cellules végétales dont la vacuole est naturellement colorée par des anthocyanes, ou de façon artificielle (grâce au rouge neutre), ou qui possèdent des organites bien visibles, comme les chloroplastes. En fonction de la concentration du milieu dans lequel les cellules sont placées, leurs vacuoles se remplissent ou se vident de leur eau, ce qui se traduit par des changements d'aspect classiques. Lorsque la cellule est turgescente, son cytoplasme est plaqué contre la paroi ; lorsqu'elle est plasmolysée, son cytoplasme est décollé de celle-ci, sa vacuole plus vivement colorée (son contenu étant plus concentré) et ses organites rassemblés de façon compacte (voir *figure* 6.6).





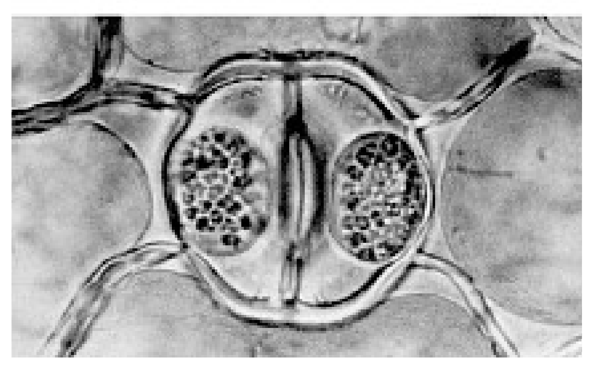


Figure 6.6

Phénomènes de turgescence et de plasmolyse chez les cellules végétales

Schémas de cellules épidermiques avec vacuoles colorées (écaille d'oignon), turgescente en haut, plasmolysée en bas.
Clichés de cellules stomatiques, avec de nombreux chloroplastes, dans un épiderme en cours de plasmolyse. Noter le décollement du cytoplasme dans les cellules plasmolysées. (Labo BG, Orsay).

Si les substances hydrophobes franchissent aisément les membranes biologiques, en se dissolvant dans la bicouche, la structure de ces dernières paraît en revanche peu propice aux échanges d'eau ; en raison de ses propriétés physicochimiques, elle semble *a priori* devoir être exclue de la bicouche hydrophobe. Aussi longtemps que l'on a

imaginé cette structure continue, la question des échanges d'eau a été difficile à résoudre : des pores aqueux étaient supposés perforer la bicouche, leur taille étant considérée comme trop petite pour pouvoir être vus, même en microscopie électronique. Cependant, on a appris depuis deux choses importantes à cet égard :

– les bicouches phospholipidiques artificielles, complètement dépourvues de protéines, sont légèrement perméables à l'eau (voir plus haut). L'agitation moléculaire déforme sans cesse les chaînes aliphatiques des acides gras qui rompent momentanément leurs interactions hydrophobes, et ainsi les molécules d'eau, en raison de leur petite taille et de leur absence nette de charge, peuvent se frayer un chemin entre elles ;
– les bicouches lipidiques naturelles sont traversées par des protéines intrinsèques transmembranaires servant de lieu privilégié de diffusion des molécules d'eau (**diffusion facilitée**).

Le rôle des protéines dans les échanges d'eau a été mis en évidence sur un modèle biologique simple : celui de la vessie de grenouille soumise à l'hormone antidiurétique. Cet organe est constitué par un épithélium simple doublé par une lame basale à fonction de filtration. Avec cette fine membrane, représentant en fait deux membranes plasmiques, on peut construire un dispositif expérimental permettant d'étudier les échanges d'eau se réalisant à travers elle. En présence d'hormone antidiurétique, le flux d'eau qui traverse l'épithélium est considérablement augmenté ; le sens de ce flux est tel que, *in vivo*, le mouvement d'eau conduit à récupérer le liquide de la vessie, ce qui diminue la diurèse. Si une analyse cytologique des membranes est menée en parallèle de ces expériences, au moyen de la technique de cryodécapage (voir chapitre 5), on note une corrélation étroite entre l'intensité du flux aqueux et la disposition des protéines intrinsèques, visualisées par des granules à la surface de la bicouche. Les images obtenues sont très voisines de celles présentées dans la *figure* 5.19 : lorsque le flux est faible, ces protéines apparaissent éparses et régulièrement réparties ; lorsqu'il est élevé, sous l'action de l'hormone, les protéines sont regroupées en paquets serrés. Il est clair que le rapprochement de protéines transmembranaires peut favoriser considérablement, sinon provoquer, le passage des molécules d'eau.

Depuis une quinzaine d'années, on sait que des protéines transmembranaires forment des canaux assurant un transport passif, mais très spécifique de l'eau (excluant celui des ions ou des métabolites), à travers la membrane plasmique. Ces protéines, collectivement nommées **aquaporines**, se rencontrent aussi bien chez les Animaux que chez les Végétaux. Chez les premiers, on les trouve en abondance dans la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires connus depuis longtemps pour être particulièrement perméables à l'eau, tels que les hématies ou les cellules des tubules proximaux du rein (dans les néphrons) ; chez les seconds, on les trouve aussi dans la membrane de la vacuole (tonoplaste). L'étude de la structure des gènes et l'établissement des profils d'hydrophobicité correspondant à ces petites protéines originales (28 kDa) suggèrent qu'elles comportent 6 hélices α transmembranaires.

2.5. Transport des ions et des petites molécules

2.5.1. Considérations générales

Les bicouches phospholipidiques étant diversement perméables aux petites molécules et parfaitement imperméables aux ions minéraux ou organiques, des mécanismes spécifiques de perméation doivent être mis en œuvre pour assurer efficacement leur transport ; ce sont en fait des **protéines porteuses** ou des **canaux protéiques** qui en sont chargés. Tous les systèmes de transport connus (canaux, perméases, pompes, etc.) sont constitués de protéines intrinsèques, transmembranaires et à traversées multiples, formant une voie continue à travers la bicouche. L'orientation de toutes ces protéines, au sein de cette dernière, est donc fondamentale afin qu'elles assurent convenablement leur fonction de transfert orienté de solutés ; la question de leur mise en place dans la membrane est traitée lors de l'étude du réticulum endoplasmique rugueux (voir chapitre 9).

Avant de les présenter en détail, il est bon de définir quelques termes relatifs aux modalités d'échange à travers les membranes :

– lorsqu'un seul composé est transporté, on parle d'**uniport** ;
– lorsque deux solutés (ou plus) sont transportés simultanément (phénomène de **couplage**), on parle de **cotransport** ;
– lorsque le transport de deux solutés se fait dans le même sens, on parle de **symport** ; s'il se fait dans des directions opposées (échange), on parle d'**antiport**.

Par ailleurs, il faut envisager deux situation différentes, selon la nature des molécules ou des ions transportés. Dans le cas des molécules non chargées, la loi physique première déterminant le sens du transport est celle de la diffusion. Ce mouvement spontané ne nécessite pas d'apport d'énergie extérieure et se fait du compartiment le plus concentré vers le compartiment le plus dilué ; on dit que le mouvement s'effectue dans le sens du **gradient de concentration**. Les cellules peuvent cependant s'opposer à la diffusion en consommant de l'énergie, généralement sous la forme d'une réaction d'hydrolyse de l'ATP, hautement exergonique. Elles sont ainsi susceptibles de transporter des ions ou des molécules à contre courant du mouvement lié au simple gradient de concentration, grâce à un mécanisme que l'on nomme **pompage**. Sur la base de cette distinction fondamentale on décrira des mécanismes de **transport passif**, ou spontanés, et des mécanismes de **transport actif**, nécessairement couplés à une source d'énergie.

Quand il s'agit de substances dissoutes électriquement chargées (ions), il faut prendre en compte, en plus de leur concentration, la différence de potentiel électrique existant entre les deux points. De façon générale, il existe une différence de potentiel de part et d'autre de toutes les membranes plasmiques : l'intérieur des cellules est négatif par rapport à l'extérieur. On comprend donc que les ions chargés (+) soient attirés par l'intérieur des cellules et que les ions chargés (–) soient repoussés vers l'extérieur ; dans les deux cas, ces ions tendent de toute façon à franchir la membrane plasmique. Le mouvement de tout ion à travers un pore ou un canal est couplé à ce qu'on appelle le **gradient électrochimique** de cet ion ; ce dernier se déplace à la fois en fonction de la différence de concentration existant de part et d'autre de la membrane et du champ électrique qui la caractérise. Si les deux forces s'exercent dans des directions opposées, le flux ionique net atteindra une valeur nulle lorsque le potentiel de membrane aura atteint lui-même une valeur telle que la force électromotrice de l'ion sera exactement équilibrée par celle due à son gradient de concentration.

2.5.2. Transports passifs par diffusion simple

Lorsqu'on analyse la diffusion simple de substances dissoutes non chargées, le seul paramètre à considérer, pour calculer le flux, est la concentration du soluté : dans la loi de Fick seule la différence des concentrations entre deux points donnés intervient (outre le coefficient de diffusion). On distingue classiquement deux types de transport s'effectuant par **diffusion simple** à travers la membrane plasmique (voir *figure* 6.7) :

– la **diffusion** dite **lipophile**, qui concerne un nombre limité de molécules capables de se dissoudre dans la bicouche lipidique des membranes plasmiques, et donc de les franchir aisément : les gaz (N_2, O_2, CO_2), les hormones stéroïdes (apparentées au cholestérol) et les hormones thyroïdiennes, elles aussi relativement hydrophobes ;

– la **diffusion directe** de l'eau à travers la bicouche (outre celle, facilitée, impliquant les **aquaporines**).

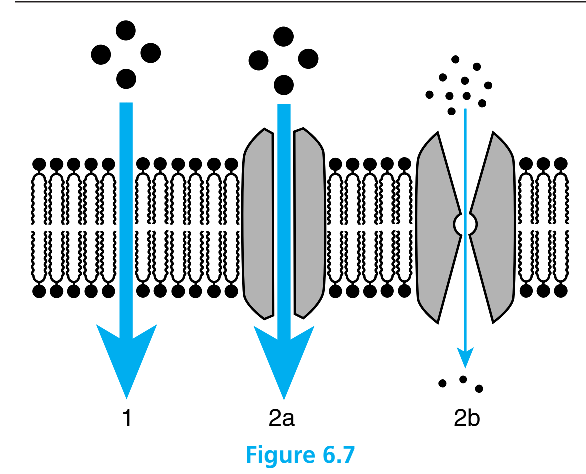


Figure 6.7

Représentation schématique des deux types de transports passifs impliquant la diffusion

(1) Diffusion directe à travers la bicouche lipidique (dite diffusion lipophile) **(2)** Diffusion facilitée impliquant un canal spécifique, pour le transport de l'eau **(2a** : aquaporines) ou des ions **(2b)**.

2.5.3. Transports passifs par diffusion facilitée : les perméases et les canaux ioniques

De très nombreux composés organiques hydrosolubles franchissent la membrane cytoplasmique beaucoup plus rapidement que ne le laisse prévoir leur coefficient de perméabilité mesuré grâce aux bicouches artificielles (10^2 à 10^4 molécules par seconde). De plus, le processus de perméation mis en œuvre présente plusieurs caractéristiques ne pouvant pas être expliquées dans le seul cadre de la diffusion simple. On observe tout d'abord un phénomène de **saturabilité du transport**, c'est-à-dire que sa vitesse n'est pas toujours proportionnelle à la concentration du soluté transporté, alors que c'est le cas pour la diffusion simple. Au-delà d'un certain seuil de concentration, celle-ci reste en effet constante, et la courbe traduisant la variation

de la vitesse en fonction de la concentration présente un plateau (voir *figure* 6.8). On peut enfin démontrer qu'il existe, dans ce cas, des composés organiques capables d'inhiber le transport des molécules normalement échangées.

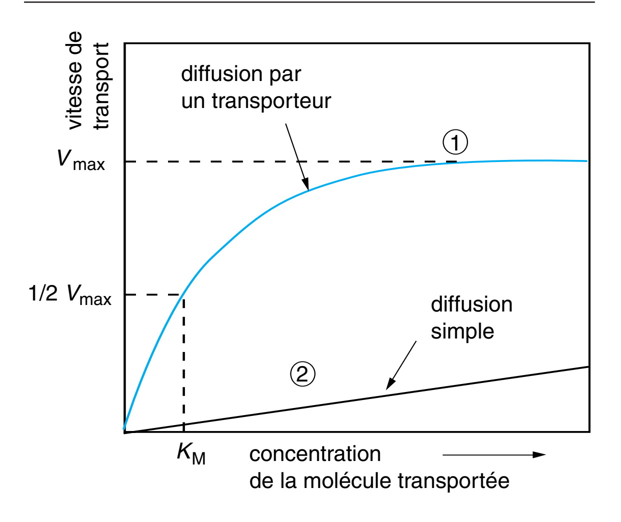


Figure 6.8

Comparaison entre les vitesses de transport observées dans la diffusion facilitée par une perméase, et dans la diffusion simple

Les vitesses initiales sont portées en fonction des différences de concentration de la molécule transportée, de part et d'autre de la membrane séparant les deux compartiments. Lorsque le transport est facilité **(1)**, on peut mesurer une vitesse maximale (V_{max}) et une constante d'affinité (K_M), équivalentes à celles définies en enzymologie.

Ces trois observations : vitesse de diffusion élevée, saturabilité et inhibition, traduisent l'existence d'une famille de transporteurs protéiques qui agissent en accélérant la diffusion de divers composés à travers la bicouche phospholipidique : on parle alors de **diffusion facilitée** et de **perméases**. Les protéines porteuses de ce type fonctionnent passivement et il n'y a pas de consommation d'énergie ; seul un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane doit exister. Une perméase fonctionne de telle sorte qu'elle ne présente jamais simultanément le site de fixation du soluté des deux côtés de la bicouche. À la différence des canaux protéiques aqueux qui permettent un passage de soluté (ion ou molécule de petite taille) au sein d'une veine liquide, il existe dans le cas des perméases un mécanisme de liaison entre le composé transporté et la molécule porteuse. Ceci a pour conséquence un **changement de conformation** de cette dernière (ou phénomène d'**allostérie**, classique en enzymologie), et le passage du soluté de l'autre côté de la membrane.

La fixation et le transfert du soluté par la perméase sont des processus semblables à ceux mis en œuvre dans une réaction classique de type enzyme/substrat. La protéine possède en effet un ou plusieurs sites de reconnaissance et de fixation spécifiques du soluté ; lorsque, pour une surface de membrane donnée, tous ces sites sont occupés, on atteint la saturation et la vitesse est maximale (V_{max}). Dans ces conditions, on peut définir une constante d'affinité (K_M) et trouver des **inhibiteurs compétitifs**, c'est-à-dire des molécules de forme voisine de la molécule à transporter et prenant sa place au niveau du site de fixation… Le formalisme classique établi en enzymologie (dit Michaelien) s'applique parfaitement à ce mécanisme de transport. La seule différence avec les enzymes est que le « substrat » n'est pas ici chimiquement modifié, mais transporté d'un compartiment à un autre.

À titre d'exemple, on peut décrire le mode de pénétration facilitée du glucose dans l'hématie humaine. Le coefficient de perméabilité de cette molécule vis-à-vis d'une simple bicouche phospholipidique est voisin de 10^{-7} cm.s^{-1} alors que vis-à-vis de la membrane de l'hématie il est supérieur à 10^{-6} cm.s^{-1}. Cette différence importante est expliquée par la présence d'une **perméase du glucose**, dont le rôle est très clair : le glucose sanguin est la seule source d'énergie des hématies, et elles en consomment beaucoup car, dépourvues de mitochondries, elles ne pratiquent que la fermentation (qui est énergétiquement peu efficace). La spécificité de ce transporteur (dit GLUT1) est élevée car seules des molécules chimiquement très voisines du glucose peuvent être transportées : D-galactose, fructose, mannose… ; d'autres composés, tels que le mannitol ou le méthyl-glucose, ne sont pas reconnus. En outre, il fait la différence entre les isomères D et L, ces derniers étant exclus du transport. Les solutés reconnus de la même famille agissent les uns vis-à-vis des autres comme des inhibiteurs compétitifs ; la perméase ne peut en effet en prendre en charge qu'un seul à la fois au cours d'un acte de transport, son choix ne se faisant que sur la base des concentrations relatives des composés mis en compétition. Chez les Mammifères, on connaît 6 formes distinctes des transporteurs GLUT, spécifiques de certains tissus et contrôlées de manière différente ; la forme GLUT4, par exemple, spécifique des muscles et du tissu adipeux, est sensible à l'action de l'insuline.

En ce qui concerne le mécanisme moléculaire du transport, les choses ne sont pas totalement éclaircies mais on connaît maintenant l'organisation générale de ces transporteurs, qui comportent douze hélices α transmembranaires. Compte tenu de ceci, il est exclu qu'un phénomène de basculement complet de la protéine soit mis en jeu, comme on l'a cru un moment. Il se produit un changement de conformation de la chaîne polypeptidique qui « ouvre » alternativement la protéine d'un côté ou de l'autre de la membrane ; à la suite de sa fixation, le substrat à transporter se trouve donc libéré sur la face opposée. Ce mécanisme est parfois décrit par l'expression imagée dite du « ping-pong » (voir *figure* 6.9). Le fonctionnement de ce transporteur est réversible, le sens du transport n'étant commandé que par les concentrations relatives de part et d'autre de la membrane. La plupart des cellules animales possèdent en fait ce type de molécule, grâce à laquelle elles absorbent le glucose, qui se trouve en concentration relativement élevée dans les fluides extracellulaires (voir *figure* 9.19).

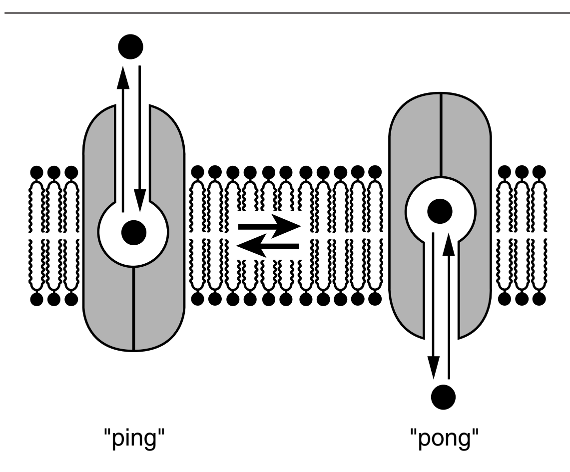


Figure 6.9

Modèle schématique illustrant le changement de conformation d'un transporteur de type perméase, et ses deux états alternatifs notés « ping » et « pong »

Suivant l'état de la molécule porteuse, le site de fixation de la molécule à transporter est ouvert d'un côté ou de l'autre de la bicouche. La transition étant probablement aléatoire, le transport est ainsi réversible.

De même que pour les enzymes, on connaît des substances bloquant complètement ou partiellement, de façon non compétitive, le transport assuré par les perméases ; ce sont les poisons du transport. Dans le cas de la perméase au glucose, la **phloridzine**, par exemple, est capable de se fixer au site de reconnaissance de la protéine, en raison de sa formule qui contient une molécule de glucose, mais ce composé ne peut lui-même être transporté, sans doute à cause de sa taille importante.

Les **canaux ioniques** constituent une vaste catégorie de protéines porteuses fonctionnant sur le principe du simple canal aqueux, c'est-à-dire un pore rempli d'eau, placé en travers de la bicouche lipidique, et au niveau duquel des ions plus ou moins strictement sélectionnés peuvent diffuser. Bien que mal connue, cette sélectivité est sans doute liée à la présence, au sein du canal, d'une chicane étroite telle que seule une catégorie précise d'ions passe facilement. On pense même que ceux-ci doivent se débarrasser de la plupart de leurs molécules d'eau associées, constituant un nuage d'hydratation périphérique. Malgré cela, les canaux ioniques représentent des systèmes très efficaces d'échange puisqu'on calcule que 10^6 à 10^8 ions les traversent à chaque seconde (c'est 10^3 à 10^4 fois plus rapide que pour n'importe quelle autre protéine porteuse). Ce type de transport est purement passif : il se fait nécessairement dans le sens du gradient de concentration et du gradient de charges électriques préexistant (gradient électrochimique), et ne consomme pas d'énergie.

Les canaux ioniques possèdent une caractéristique fondamentale : il s'agit de « portes » en général fermées, dont l'ouverture brève est commandée par un signal extérieur. Il existe plusieurs types de canaux : 1) les canaux s'ouvrant sous l'action d'une modification du champ électrique transmembranaire (on parle de **canaux régulés par le potentiel membranaire**), 2) les canaux sensibles à la fixation d'un ligand qui peut être un ion, un neurotransmetteur, un nucléotide ou même une protéine (**canaux régulés par un ligand**), et 3) les canaux sensibles à des phénomènes mécaniques (**canaux régulés mécaniquement**), voir chapitre 13.

Toutes les cellules animales, végétales ou bactériennes possèdent de tels canaux ioniques mais les premières sont les plus riches, et en particulier les cellules nerveuses et musculaires (**cellules** dites **excitables**). Une seule cellule nerveuse contient au minimum dix espèces distinctes de canaux ioniques et on en connaît plus d'une centaine, dont un grand nombre dans les cellules banales. Les canaux les plus répandus, et présents dans la membrane plasmique de presque toutes les cellules animales, sont paradoxalement des canaux toujours ouverts (non réglés) perméables au K^+ ; ce sont les **canaux** dits **de fuite du** K^+, qui interviennent dans le maintien du potentiel de membrane

typique de toutes les membranes plasmiques. La *figure* 6.10 montre comment on peut se représenter un canal ionique à ouverture contrôlée dans ses deux états alternatifs, ouvert ou fermé.

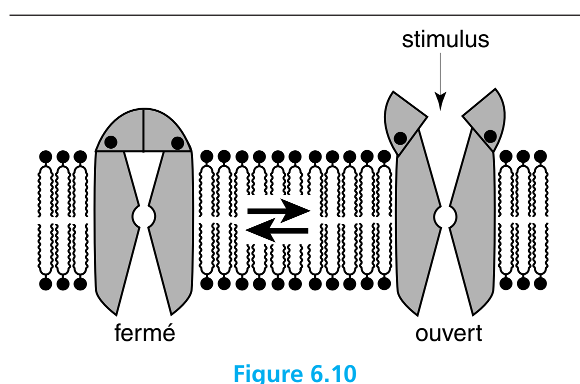


Figure 6.10

Représentation schématique des deux états possibles d'un canal ionique

En général fermé, un tel canal s'ouvre sous l'action d'un stimulus électrique (dépolarisation membranaire), chimique (ligand extra- ou intracellulaire), ou mécanique (vibration).

Le plus connu de ces canaux est le **canal cationique réglé par l'acétylcholine**, rencontré dans les cellules du muscle squelettique, au niveau des jonctions neuromusculaires. Il transforme un signal chimique : la libération d'acétylcholine au niveau de la terminaison nerveuse, en un signal électrique transitoire, par l'intermédiaire d'un mouvement d'ions. Ce signal est lui-même perçu par des canaux réglés par la tension, qui sont à l'origine d'un potentiel d'action propagé le long de la membrane plasmique de la cellule musculaire.

2.5.4. Transports actifs primaires

Ils sont assurés par des complexes protéiques, appelés **pompes**, qui utilisent en général l'énergie d'hydrolyse de l'ATP, de façon directe, pour propulser uniquement des ions à travers les membranes, contre leur gradient de concentration. Il en existe un grand nombre, de types très différents, qui transportent un ou plusieurs ions ; nous étudierons tout d'abord en détail le fonctionnement de la pompe la mieux connue : la pompe Na^+/K^+ de la membrane plasmique des cellules animales.

• La **pompe Na^+/K^+** des cellules animales. Le *tableau* 6.2 montre que la concentration en ions K^+ est environ 30 fois plus élevée à l'intérieur des cellules qu'à l'extérieur, alors que la situation est inverse pour les ions Na^+ (d'un facteur 10 à 15). La raison de ces déséquilibres ioniques est due à la présence de la pompe Na^+/K^+, située dans la membrane plasmique, qui chasse les ions Na^+ vers l'extérieur et concentre simultanément les ions K^+ dans le hyaloplasme, « luttant » sans cesse contre les gradients de concentration de ces ions. Le caractère actif de ce système transporteur est aisément démontré chez les hématies de Mammifères, en raison de leur simplicité d'organisation et de manipulation, déjà mentionnées. Tout facteur conduisant à une diminution interne de la fourniture d'ATP entraîne à bref délai la disparition du déséquilibre ionique ; l'absence de substrat énergétique (ici, le glucose), ou la présence de certaines drogues affectant le métabolisme énergétique ont le même résultat. On considère que près du tiers de l'énergie cellulaire dépensée dans une cellule animale banale sert en fait à faire fonctionner cette pompe. Nous verrons plus loin l'importance capitale du maintien de ces gradients, en particulier celui du Na^+, comme source d'énergie potentielle utilisable pour d'autres transports.

Ions	Cytoplasme (mM)	Milieu intérieur (mM)
Na^+	10 – 15	145
K^+	140 – 150	4-5
Mg^{2+}	0,6 – 0,8	1 – 2
Ca^{2+}	$1 – 2.10^{-4}$	1,5 – 2
Cl^-	4 – 6	110 – 120
$HC0_3^-$	8 – 12	28
p^-	140	9

Tableau 6.2

Concentrations ioniques (ions libres seulement) typiques du cytoplasme des cellules de Mammifères et du milieu intérieur (plasma sanguin) dans lequel elles vivent

Ces deux compartiments contiennent autant de charges positives que négatives et sont électriquement neutres. P^- désigne toutes les molécules portant des charges négatives : protéines, acides nucléiques, métabolites ionisés, etc., qui les caractérisent.

La pompe Na^+/K^+ fut tout d'abord identifiée comme une enzyme hydrolysant l'ATP (ATPase), seulement en présence d'ions Na^+ et K^+. Il fut montré par la suite qu'elle était inhibée par une drogue nommée **ouabaïne**, qui était par ailleurs connue pour supprimer le transport membranaire de ces ions. Sa localisation spécifique dans la membrane plasmique permit enfin de conclure que l'ATPase et la pompe supposée exister ne constituaient qu'une seule et même entité. D'élégantes expériences réalisées sur les membranes

des hématies ont conduit à bien caractériser cette activité. Après hémolyse ménagée, on peut faire se « refermer » la membrane autour d'un milieu de composition contrôlée, aussi bien du point de vue ionique (on peut alors utiliser des ions radioactifs pour faciliter l'analyse) que de la concentration en ATP ou en inhibiteurs. Après centrifugation, le transfert des cellules dans un autre type de milieu est suivi de l'étude des flux ioniques. Les observations suivantes sont faites : 1) les transferts de Na^+ et K^+ sont obligatoirement couplés à l'hydrolyse de l'ATP, 2) la présence simultanée d'ions K^+ à l'extérieur des cellules et d'ions Na^+ à l'intérieur est indispensable à la mise en route des échanges, 3) la ouabaïne n'agit comme inhibiteur que si elle est à l'extérieur des cellules, où elle entre en compétition avec les ions K^+ au niveau d'un site de liaison commun, et 4) pour chaque ATP hydrolysé, 3 Na^+ sont échangés contre 2 K^+.

Le lien précis existant entre l'hydrolyse de l'ATP et les étapes de transfert des ions est maintenant bien compris ; ce mécanisme en 6 étapes est illustré dans la *figure* 6.11. L'échange de deux ions (+) contre trois ions (+), au cours d'un même événement (cotransport de type antiport), conduit à un déséquilibre de charges électriques entre les deux faces de la membrane ; on dit que la **pompe** est **électrogénique**. C'est une composante du potentiel électrique caractérisant la membrane plasmique de toute cellule vivante (**potentiel de membrane**). En chassant les ions Na^+ qui ont tendance à entrer dans

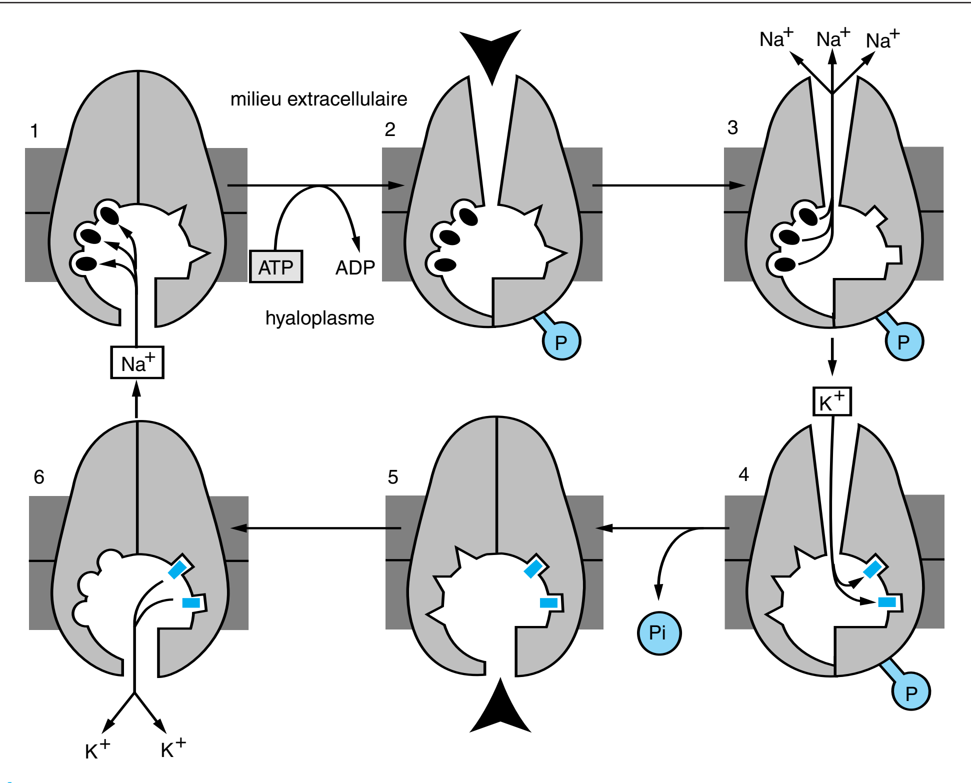


Figure 6.11

Modèle schématique illustrant le fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante des cellules animales

(1) Trois ions Na^+ se fixent sur la face interne de la protéine, qui est ouverte vers l'intérieur de la cellule. Les sites de fixation des ions K^+ sont fermés.
(2) L'ATP phosphoryle le domaine protéique tourné vers le hyaloplasme. Un changement de conformation de la protéine a lieu, qui s'ouvre vers l'extérieur.
(3) Les trois ions Na^+ préalablement fixés sont en conséquence exposés à l'extérieur, où ils sont libérés. Ce phénomène fait alors s'ouvrir deux sites de fixation des ions K^+.
(4) Deux ions K^+ se fixent à leur tour, ce qui a pour conséquence la déphosphorylation de la protéine (Pi : phosphate inorganique), et la fermeture des sites Na^+.
(5) Un nouveau changement de conformation, conduisant à un « basculement » en sens inverse, ouvre la protéine vers l'intérieur.
(6) Les ions K^+ sont exposés à l'intérieur où ils sont libérés ; les sites de fixation des ions Na^+ réapparaissent. Le cycle recommence avec une nouvelle fixation des ions Na+ et une phosphorylation par l'ATP.

la cellule, la pompe Na^+/K^+ tend aussi à abaisser la pression osmotique interne et à assurer un volume constant au hyaloplasme. En effet, lorsque des cellules animales sont traitées par la ouabaïne, le flux entrant d'eau augmente et elles ont tendance à gonfler (elles peuvent même éclater).

Cette pompe est un tétramère constitué de deux types de sous-unités, la plus grosse des deux (appelée α) possédant toutes les activités que l'on vient de décrire : il s'agit d'une chaîne longue de 1 000 acides aminés environ, qui traverse 10 fois la bicouche phospholipidique. Le rôle de la petite sous-unité (dite β) est mal connu ; il s'agit d'une glycoprotéine, qui a donc un domaine tourné vers l'extérieur de la cellule (voir *figure* 6.12). La position de ce complexe par rapport à la bicouche est déterminante pour son fonctionnement polarisé ; la question cruciale de la mise en place précise d'une protéine dans une membrane sera traitée dans le chapitre 9. À côté de la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante, il existe des pompes ayant un fonctionnement apparemment plus simple et ne transportant qu'un seul ion à la fois (uniport). Les exemples les plus connus sont ceux des pompes à calcium et des pompes à protons.

• Les **pompes à Ca^{2+}**. Dans toutes les cellules eucaryotiques, la concentration hyaloplasmique en Ca^{2+} libre est très faible (environ 10^{-7} M), alors que celle du milieu extérieur est 10^4 fois plus élevée. Le gradient de Ca^{2+} est maintenu grâce à une pompe

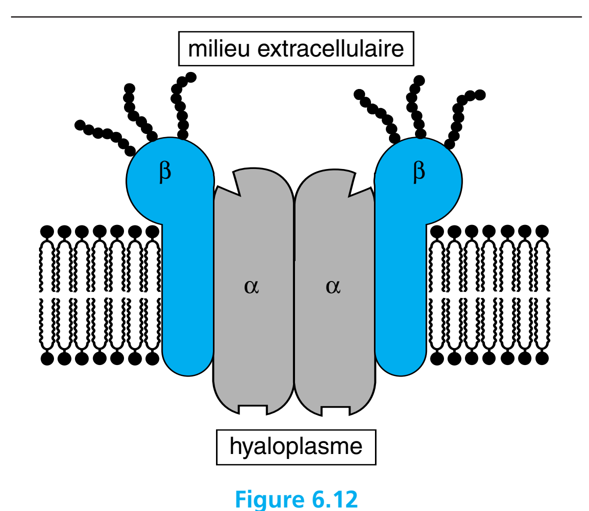


Figure 6.12

Organisation schématique de la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante

Cette protéine transmembranaire, formée de 4 sous-unités, est de type α_2-β_2. Les sous-unités α et β sont de taille différente ; les deux sous-unités β sont glycosylées.

ATP dépendante localisée dans leur membrane cytoplasmique, et qui a pour rôle de chasser le calcium libre intracellulaire. Cette pompe existe aussi dans la membrane d'un compartiment vésiculaire interne, de type réticulum endoplasmique lisse (voir chapitre 9), appelé **compartiment de rétention du calcium**. Ce dernier semble être un constituant normal de toute cellule, mais il est particulièrement développé dans les cellules musculaires striées, où il porte le nom de **réticulum sarcoplasmique**. Dans ce cas, les pompes Ca^{2+} ATP dépendantes ont comme fonction de séquestrer et accumuler les ions Ca^{2+} au sein de vésicules spécialisées ; on connaît le rôle de ces derniers dans le déclenchement de la contraction musculaire. L'intérêt de maintenir une concentration très faible en Ca^{2+} dans les cellules banales tient au fait que cet ion est un « messager secondaire », et tout signal conduisant à son afflux dans le hyaloplasme entraîne une cascade d'événements et l'activation d'un grand nombre de mécanismes pysiologiques.

• Les **pompes à protons**. Ces transporteurs sont rencontrés dans la membrane plasmique des cellules végétales et des Champignons, et chez quelques Bactéries ; ils permettent d'expulser uniquement des ions H^+, grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Leur rôle physiologique, qui consiste à maintenir un gradient ionique transmembranaire, est équivalent à celui décrit plus loin pour la pompe Na^+/K^+ des cellules animales. On trouve également des pompes à protons dans le compartiment vacuolaire des Végétaux (au niveau du tonoplaste) et dans le compartiment endosomal des cellules animales (voir plus loin) ; dans ce cas particulier, les pompes fonctionnent en accumulant les ions H^+ à l'intérieur de la lumière des vésicules, qui s'acidifient rapidement. La concentration en protons y atteint plus de 100 fois celle du hyaloplasme. Cette acidification entraîne l'activation des hydrolases acides libérées dans les vésicules issues du compartiment endosomal, après fusion avec les lysosomes primaires d'origine golgienne (voir chapitre 7).

Malgré l'unité de fonction qui rassemble ces différents transporteurs, les spécialistes distinguent trois grandes familles de molécules, en fonction de la disposition et du nombre de chaînes polypeptidiques, et de leur mode d'action au niveau moléculaire. Les pompes Na^+/K^+ et Ca^{2+}, qui ont une organisation très voisine et relativement simple, sont évolutivement apparentées et leurs gènes dérivent d'un même gène ancestral. En revanche, les pompes à protons appartiennent à trois types

distincts et leur complexité peut égaler celle des gros complexes nommés **ATP synthétases**, trouvés par exemple dans les membranes internes des mitochondries. Ces derniers sont classés dans la famille des pompes, mais ils fonctionnent normalement en sens inverse du sens habituel, car ils fabriquent en fait de l'ATP, à partir d'un gradient de protons préexistant ! (voir chapitre 10).

De façon générale, toutes les pompes sont réversibles ; en effet, si on impose, d'une manière ou d'une autre, un gradient ionique transmembranaire supérieur à celui qu'elles peuvent créer, elles laissent passer les ions dans le sens du gradient et fonctionnent alors en synthétisant l'ATP, et non pas en l'hydrolysant. La membrane plasmique de nombreuses Bactéries contient de gros complexes transmembranaires capables d'expulser des protons du cytoplasme en utilisant comme source d'énergie des **réactions d'oxydoréduction**. Ces complexes, qui sont typiquement des pompes, bien que non mues par l'ATP, sont semblables à ceux rencontrés dans les organites semi-autonomes : mitochondries et plastes (voir chapitre 10). Il faut enfin mentionner l'existence d'une pompe à protons tout à fait unique dans le monde vivant, et qui est mue par la lumière ; cette curiosité se rencontre chez une Archébactérie halophile : *Halobacterium halobium* (voir chapitre 2).

COMMENTAIRE

La bactériorhodopsine de *Halobacterium*

Cette Bactérie possède, dans sa membrane plasmique, une protéine intrinsèque très abondante, qui forme des plaques pseudocristallines, appelées **plaques de membrane pourpre** (en raison de leur couleur). Cette protéine, nommée **bactériorhodopsine**, traverse la bicouche lipidique sous forme de 7 hélices α hydrophobes étroitement serrées. Chacune de ces molécules contient un groupement prosthétique : le **rétinal**, qui est identique à celui trouvé dans la rhodopsine ; cette dernière constitue le photorécepteur des cellules visuelles en bâtonnet de la rétine des Vertébrés.

Le phénomène de pompage des protons est le suivant : lorsque la cellule est vivement éclairée, il se produit un changement de conformation de la bactériorhodopsine sous l'action des photons, qui conduit à une expulsion de protons à travers la membrane cytoplasmique, à partir du cytoplasme. Ce transfert permet de créer un gradient transmembranaire de protons utilisable par une ATP synthétase membranaire classique, pour produire de l'ATP. On a donc affaire à un mécanisme de **photosynthèse** très simple et très original, car fonctionnant sans chlorophylle, sans aucun rapport avec celui décrit chez les Bactéries ou les Végétaux verts. Ce système permet aux cellules, normalement aérobies et pratiquant la respiration, de survivre à la lumière lorsque la quantité d'O_2 ambiant est insuffisante.

Cette molécule est le prototype d'une vaste famille de protéines transmembranaires (plus de 150), toutes bâties sur le même modèle, et présentes chez tous les êtres vivants ; on compte parmi elles de nombreux récepteurs de surface pour des hormones, chez les Animaux supérieurs (voir chapitre 5).

- Les **transporteurs ABC**. Ces transporteurs, dits « ABC » pour *ATP binding cassette*, sont très répandus chez tous les êtres vivants, des Bactéries à l'Homme. On en a déjà identifié plusieurs centaines de formes et leur nombre ne cesse de croître. Ces protéines originales hydrolysent l'ATP pour transporter spécifiquement des ions, mais aussi des sucres, des acides aminés, des polysaccharides ou des protéines. Leur organisation générale est la suivante : douze hélices transmembranaires hydrophobes, organisées en deux ensembles, et deux domaines hydrophiles cytosoliques liant l'ATP et l'hydrolysant pour assurer un transport actif, par changement de conformation des premiers.

Chez les Mammifères, ces transporteurs sont localisés dans la membrane plasmique des cellules du rein, de l'intestin, du foie, où ils participent à la détoxification du cytoplasme. Leur surexpression dans les cellules cancéreuses pose un problème grave chez l'Homme, car ils chassent du cytoplasme les drogues utilisées en chimiothérapie, qui deviennent inefficaces. On connaît aussi un transporteur ABC localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique, et qui y importe activement les peptides issus de la dégradation des protéines réalisée par les protéasomes (voir chapitre 9). C'est la première étape dans le processus de surveillance immunitaire à travers le phénomène de « présentation de l'antigène » à la surface des cellules. Un autre exemple de ces molécules est le canal chlore des cellules épithéliales bronchiques qui est non fonctionnel chez les malades de la mucoviscidose (voir : Perspective biomédicale).

2.5.5. Transports actifs secondaires

Contrairement aux molécules porteuses précédentes, les transporteurs assurant un **transport actif** dit **secondaire** n'utilisent pas l'hydrolyse de l'ATP comme source directe d'énergie. Ils sont néanmoins dits actifs car ils peuvent transporter des ions ou des molécules organiques contre leur gradient de concentration ; ceci est réalisé grâce au couplage de ce transport à celui d'un autre composé qui, lui, se déplace spontanément dans le sens de son gradient. En règle générale, ce deuxième composé, qui agit comme moteur, est un ion présentant un fort gradient de concentration (ions Na^+, dans le cas des cellules animales, ou H^+, dans le cas des cellules végétales ou des Bactéries), qui est entretenu, on l'a vu, par des pompes utilisant l'ATP ou des réactions d'oxydoréduction. En fait, un transporteur actif de ce type utilise une source d'énergie indirecte (ou potentielle), stockée sous la forme d'un gradient ionique.

Ce système impliquant nécessairement un cotransport, la protéine responsable doit posséder deux sites de reconnaissance : l'un pour l'**ion moteur** et l'autre pour le soluté à transporter (voir *figure* 6.13). La fixation de l'ion moteur sur son site induit une transition allostérique de la protéine, favorisant de façon importante la fixation du soluté sur son propre site. Il faut donc bien comprendre que si le gradient ionique moteur se réduit, la vitesse de transport de l'ion cotransporté est elle-même réduite. À la limite, le système peut fonctionner dans l'autre sens si les gradients, pour une raison ou une autre, viennent à s'inverser ; le principe reste en effet le même : l'ion qui présente le gradient le plus fort propulse toujours l'ion qui a le gradient le plus faible. Ce type de mécanisme permet de transporter simultanément un ion et une petite molécule organique ou bien deux ions. On sera donc toujours amené à distinguer deux situations, selon que les transports sont de type symport ou antiport. Quelques exemples choisis dans les cellules animales, végétales ou chez les Bactéries peuvent être décrits.

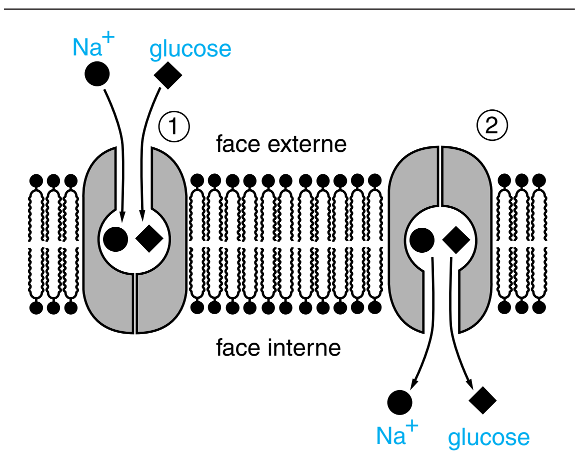


Figure 6.13

Mode de fonctionnement schématique d'un transporteur actif secondaire basé sur un gradient d'ions Na^+

La fixation d'un ion Na^+ sur la face externe de la membrane (où ces ions sont très concentrés) favorise ici celle d'une molécule de glucose. Le changement de conformation de la molécule porteuse ouvre ensuite les deux sites sur la face interne de la membrane, où les deux solutés sont libérés. Le mouvement spontané des ions Na^+, dans le sens de leur gradient de concentration, entraîne ainsi celui du glucose, contre son propre gradient.

• Le **transporteur intestinal du glucose**. Les microvillosités des entérocytes portent dans leur membrane un transporteur spécifique, le **symport Na^+/glucose**, qui utilise le fort gradient transmembranaire de Na^+ (entretenu par la pompe Na^+/K^+ ATP asique décrite plus haut), pour faire pénétrer spécifiquement le glucose intestinal dans la cellule. La concentration en glucose dans l'entérocyte étant ainsi relativement élevée, celui-ci sort de façon spontanée, par diffusion facilitée au niveau de la membrane basolatérale, grâce à un système de perméase simple semblable à celle décrite pour l'hématie humaine (voir *figure* 6.14). C'est de cette façon que le glucose issu de la digestion des glucides alimentaires franchit l'épithélium intestinal, et se retrouve dans le milieu intérieur. La position précise des deux types de transporteurs du glucose au sein des différents domaines membranaires de l'entérocyte est donc fondamentale, et elle constitue un excellent exemple de polarité structurale et fonctionnelle. Les **jonctions serrées** sous-apicales, qui unissent deux cellules voisines dans l'épithélium (voir chapitre 14) permettent de confiner les deux types de protéines dans leurs domaines spécifiques et jouent, en empêchant la diffusion latérale, un rôle de barrière au sein de la bicouche. La question de l'adressage précis de ces deux protéines vers leurs domaines respectifs reste posée (voir chapitre 9 et *figure* 9.19).

De nombreux autres transporteurs à Na^+ existent dans les cellules animales (dans l'épithélium rénal, en particulier) où ils assurent l'absorption de divers métabolites : glycérol, oses, acides aminés… Ceci montre l'importance considérable du maintien du gradient de Na^+ pour l'économie cel-

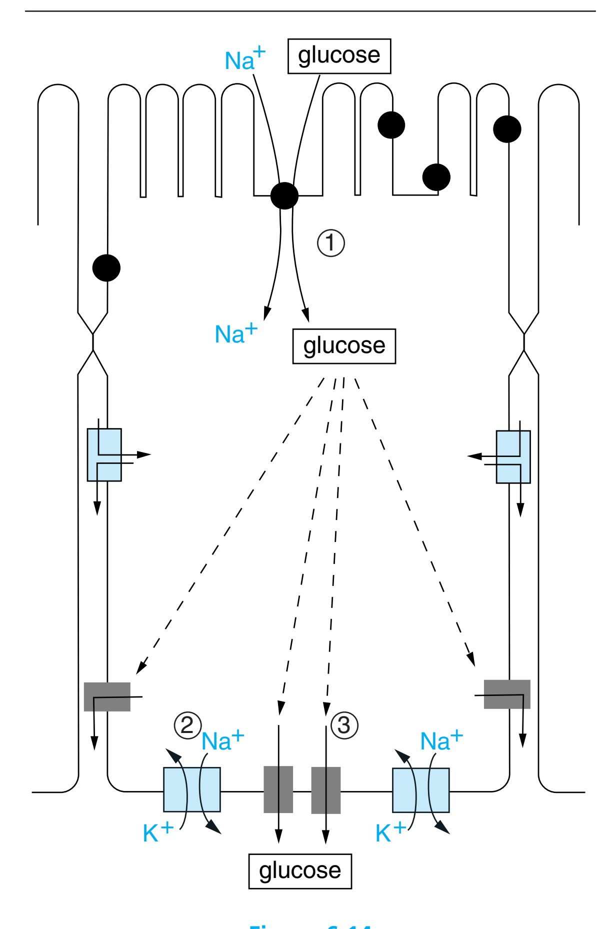


Figure 6.14

Schéma illustrant le transport du glucose intestinal à travers un entérocyte

Trois molécules porteuses sont en jeu, dont les distributions membranaires sont capitales pour assurer le passage unidirectionnel de ce composé à travers l'épithélium intestinal. Le symport Na^+/glucose (1) est localisé sur la face apicale absorbante, tandis que la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante (2) et la perméase (3) sont confinées dans la membrane basolatérale.

lulaire (et le métabolisme en général), et justifie l'énorme dépense énergétique effectuée par les cellules, dans ce but.

• Le **transporteur bactérien du lactose**. Il existe, chez les Bactéries, un transporteur spécifique du lactose qui fonctionne comme le symport précédent, mais en utilisant un gradient moteur d'ions H^+ (voir p. 91) Ceux-ci sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule qu'à l'intérieur car des pompes appartenant à la membrane plasmique, mues par l'ATP ou les réactions d'oxydoréduction, interviennent ici aussi ; le retour des ions H^+ vers le cytoplasme permet l'importation du lactose à raison d'un ion pour une molécule. La protéine responsable de ce cotransport est constituée d'une chaîne polypeptidique d'environ 400 acides aminés, traversant plusieurs fois la bicouche lipidique (douze aller et retour en α hélice). Un grand nombre de transporteurs actifs de ce type ont été mis en évidence chez les Bactéries : ils servent aussi à importer les sucres, les acides aminés ou les acides organiques…, nécessaires au métabolisme.

• Les **échangeurs commandés par le gradient d'ions H^+** présents dans la membrane plasmique des cellules végétales. Celle-ci contient de nombreux transporteurs destinés à importer des molécules organiques, dont le fonctionnement est semblable à celui des exemples précédents. Il faut aussi signaler l'existence d'un **symport H^+/K^+** servant à faire entrer activement ce dernier ion dans la cellule. Ce système permet sans doute de contrôler la pression osmotique interne et de maintenir la turgescence à un niveau suffisant, malgré les variations du milieu extérieur.

• L'**antiport Na^+/H^+** des cellules de Vertébrés. Dans presque toutes les cellules de ces organismes, il existe une protéine échangeuse de cations d'un type voisin de la précédente, qui intervient pour contrôler le pH intracellulaire. Grâce à ce système d'échange, un excès interne d'ions H^+ (lié au métabolisme cellulaire) est supprimé par une sortie de ces derniers, couplée à un influx d'ions Na^+. Cette protéine est régulée par le pH, au niveau d'un site de fixation de H^+ situé du côté cytoplasmique : si le pH dépasse 7,7 à l'intérieur de la cellule, la molécule est inactivée, le flux sortant d'ions H^+ stoppé, et le cytoplasme retourne à la neutralité.

• L'**échangeur d'anions HCO_3^-/Cl^-** des hématies de Mammifères. La protéine la plus abondante de leur membrane plasmique (dite aussi «bande 3», sur les gels d'électrophorèse) est un transporteur d'ions dont le rôle est capital dans le cadre des échanges gazeux que ces cellules assurent. Le CO_2 produit par les tissus rentre dans les hématies où il est enzymatiquement transformé en HCO_3^- ; ce dernier en sort grâce à cet échangeur d'anions qui fait simultanément entrer un ion Cl^-. Au niveau des poumons, les réactions inverses ont lieu : le CO_2 étant éliminé des hématies, les ions HCO_3^- dissous en grande quantité dans le plasma entrent dans celles-ci, où ils sont à nouveau échangés contre des ions Cl^-. Ce processus inverse d'antiport est réalisé grâce à la même protéine, dont le fonctionnement est donc totalement réversible.

Cette protéine transmembranaire de près de 1 000 acides aminés de long est une grosse protéine à traversées multiples (12 ou 14 fois) ; elle forme probablement des dimères ou des tétramères, qui sont aisément visibles grâce à la technique de cryofracture, sous forme des particules de 7,5 nm de diamètre se détachant sur le fond uni de la bicouche phospholipidique. On compte environ 10^6 chaînes polypeptidiques par cellule, associées étroitement au cytosquelette sous-membranaire. Ce transporteur est aussi présent dans de très nombreux types cellulaires.

Il faut enfin mentionner que de nombreux transporteurs de ce type, véhiculant des ions ou des molécules organiques selon le mode de l'antiport ou du symport, existent dans la membrane interne des mitochondries et des chloroplastes. Nous analyserons dans le chapitre 10 le rôle très important que jouent ces molécules dans le métabolisme de ces organites. Comme les complexes d'oxydoréduction signalés plus haut, ils dérivent très certainement de systèmes appartenant à la membrane plasmique des ancêtres bactériens dont ils descendent (voir chapitre 16).

2.5.6. Les ionophores et leur utilisation

Ce sont des composés hydrophobes de petite taille, ayant la propriété de se dissoudre dans les bicouches lipidiques et de favoriser le passage des ions à travers les membranes. Ils sont en général synthétisés par divers micro-organismes qui les

Commentaire

Les ionophores

La **valinomycine** est un transporteur mobile, dont la formule est donnée dans la *figure* 6.15 ; sa région centrale est polaire et sa périphérie est porteuse de chaînes latérales associées à des acides aminés hydrophobes (en particulier, la valine). Grâce à sa structure annulaire, elle protège la charge d'un ion K^+ de sorte que celui-ci peut pénétrer dans l'environnement hydrophobe d'une bicouche lipidique. De même, l'**ionophore** dit **A 23187** transporte des cations divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+}. Ce genre de transporteur qui se dissout dans la bicouche devient inefficace à basse température, quand la membrane se fige et que la fluidité devient insuffisante. Ce comportement oppose de tels composés aux ionophores formant des canaux.

La **gramicidine A** est un de ces transporteurs ; c'est un peptide de quinze acides aminés hydrophobes, organisé en hélice, qui fonctionne à l'état de dimère. On trouve un monomère par monocouche lipidique ; lorsque les monomères se disposent en vis-à-vis, il se forme un canal transmembranaire permettant le passage des cations monovalents (dans l'ordre décroissant d'efficacité : H^+, K^+, Na^+). Les canaux formés sont instables, car les dimères se dissocient rapidement, mais l'efficacité est néanmoins considérable, puisque 20 000 cations franchissent chaque canal par milliseconde !

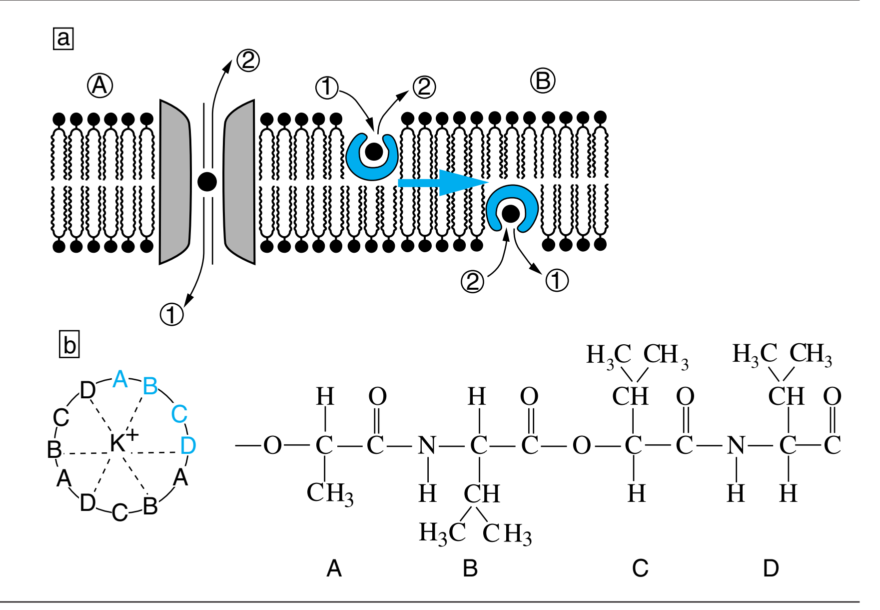


Figure 6.15
Mode de fonctionnement des ionophores
(a) A : ionophore de type canal ; B : ionophore de type navette.
(b) Formule de la valinomycine, qui est un transporteur mobile (navette), formé de trois segments identiques répétés et refermés sur eux-mêmes.
A : lactate ; B et D : valine ; C : hydroxyisovalérate.

utilisent comme moyens de défense vis-à-vis de leurs concurrents ; c'est à ce titre que certains sont utilisés par l'Homme comme antibiotiques. Ils sont aussi employés par les chercheurs, car ils augmentent de façon spécifique la perméabilité à des ions tels que Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} …, et constituent donc des outils irremplaçables pour les analyses des transports membranaires. Deux classes d'**ionophores** existent : ceux qui agissent comme des transporteurs mobiles (ou navettes) et ceux qui forment des canaux. Dans tous les cas, ils ne favorisent que des transports passifs, régis par la diffusion et s'effectuant donc dans le sens des gradients électrochimiques.

On comprend donc pourquoi les ionophores naturels constituent de puissants antibiotiques antibactériens : ils suppriment tous les gradients ioniques, indispensables à la vie des cellules.

3. TRANSPORT MEMBRANAIRE DES MACROMOLÉCULES ET DES PARTICULES CHEZ LES EUCARYOTES

Les phénomènes d'échange analysés jusqu'ici relèvent du mécanisme général de la perméation, c'est-à-dire du passage à travers la membrane cytoplasmique ; les protéines de transport mises en jeu ne peuvent transporter que des petites molécules organiques polaires ou des ions (minéraux ou organiques). Or, la plupart des cellules eucaryotiques sont capables d'absorber ou de sécréter des macromolécules, telles que des protéines ou des polysaccharides. Certaines, même, peuvent ingérer des particules de grande taille, y compris des cellules guère plus petites qu'elles. Le mécanisme de franchissement de la membrane plasmique mis en œuvre ici est tout à fait particulier et il implique la formation de vésicules limitées par une membrane simple.

3.1. Notions d'endocytose et d'exocytose

Suivant le sens du mouvement, on distingue deux grands types de processus : l'**endocytose**, qui recouvre les événements d'**intériorisation** (pénétration) de matériel, et l'**exocytose**, qui concerne au contraire ceux associés à la **sécrétion** de composés dans le milieu extérieur. Dans l'endocytose, la membrane plasmique s'invagine progressivement au niveau de la zone où le matériel extracellulaire doit être absorbé (= endocyté), puis elle se pince et forme une vésicule close ; les étapes initiales sont un peu différentes selon que les particules absorbées sont des macromolécules ou des particules de grande taille. Dans l'exocytose, ce sont des vésicules d'origine interne à la cellule, le plus souvent issues du réseau transgolgien des dictyosomes (voir chapitre 9), qui sont chargées de produits de sécrétion. Après s'être ouvertes au niveau de la membrane cytoplasmique, elles émettent leur contenu à l'extérieur de la cellule (voir *figure* 6.16).

Ces phénomènes, tout à fait spécifiques des cellules eucaryotiques, présentent des caractéristiques communes évidentes : 1) ils impliquent des phénomènes de fusion des bicouches lipidiques

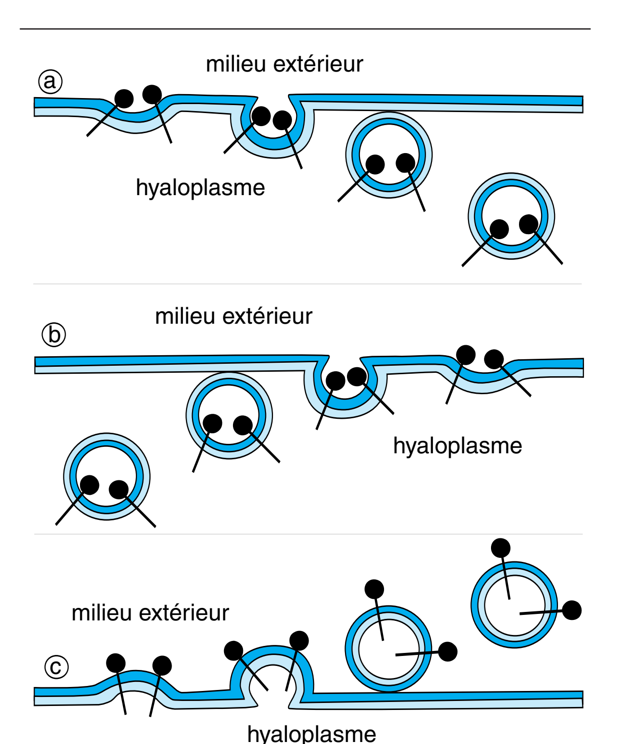


Figure 6.16

Principes de l'endocytose **(a)**, de l'exocytose **(b)** et du bourgeonnement **(c)**

Tous ces phénomènes membranaires impliquent des mécanismes d'adhérence et de fusion de bicouches lipidiques, concernant soit les faces hyaloplasmiques, soit les faces externes des membranes ; ceux-ci sont en fait favorisés par des protéines intrinsèques non figurées ici. Noter la différence entre exocytose et bourgeonnement, en ce qui concerne les rapports entre le contenu de la structure vésiculaire mise en jeu et le milieu extérieur.

membranaires après que celles-ci se soient étroitement juxtaposées, et 2) les substances absorbées ou sécrétées sont toujours séquestrées par une membrane et ne se mélangent jamais avec les constituants du hyaloplasme. Il existe donc une certaine parenté biochimique entre membranes des vésicules et membrane cytoplasmique.

En fonction de la taille du matériel absorbé, on distingue deux processus mettant en jeu des mécanismes différents : 1) la **pinocytose** (au sens étymologique, la «boisson» de la cellule), qui est l'ingestion de fluides ou de macromolécules, au moyen de petites vésicules de diamètre voisin de 150 nm, et 2) la **phagocytose**, qui est l'absorption de grosses particules ou de cellules, au moyen de vésicules de diamètre supérieur à 250 nm, et pouvant atteindre plusieurs µm : les **phagosomes** («l'alimentation» de la cellule). Chez les cellules ne pratiquant pas la phagocytose, l'usage actuel tend à confondre endocytose et pinocytose ; ces deux termes sont donc parfois utilisés indifféremment.

La phagocytose a été décrite pour la première fois par E. Metchnikoff, en 1854, au niveau de cellules mobiles des larves d'étoiles de mer. Chez les Animaux, la plupart des cellules sont capables de pinocytose, tandis que le deuxième processus est réservé à certaines cellules spécialisées (voir plus loin). En revanche, de très nombreux Protistes utilisent naturellement cette voie pour se nourrir : les paramécies, par exemple, ingèrent les Bactéries grâce à leur bouche, qui est une région spécialisée pour la phagocytose (voir chapitre 2). Nous verrons plus loin en détail que la plupart des constituants absorbés de cette façon sont dirigés vers le **compartiment lysosomal**, après avoir été triés et sélectionnés dans un compartiment membranaire intermédiaire appelé **compartiment endosomal**. Les lysosomes contiennent un grand nombre d'hydrolases (enzymes de dégradation), et la majorité des matériaux capturés sont finalement digérés et les produits obtenus, en général des petites molécules simples, servent à nourrir la cellule.

Nous serons amenés à reparler d'endocytose à deux occasions : 1) lors de l'étude de la motilité cellulaire (chapitre 11), car on pense qu'un flux orienté de membranes vers la zone frontale des cellules en culture, créé par des cycles d'endocytose et d'exocytose, contribue à leur déplacement, et 2) lors de l'étude des Virus des Animaux, car nombre d'entre eux utilisent ce mécanisme pour pénétrer à l'intérieur de leurs cellules-hôtes spécifiques (chapitre 15).

3.2. Phénomènes de pinocytose

3.2.1. Formation des vésicules de pinocytose

Ce processus commence en général au niveau de petits disques légèrement concaves trouvés dans la membrane plasmique, dont le diamètre est d'environ 0,2-0,4 µm. Sur les coupes fines de microscopie électronique, ces petites dépressions sont le plus souvent caractérisées par un feutrage 2 à 3 fois plus épais que la membrane plasmique elle-même, situé du côté hyaloplasmique (voir *figure* 6.17). Ces structures, nommées **puits recouverts**, donnent naissance par invagination progressive, à des dépressions de plus en plus profondes qui finissent par se pincer et former des vésicules closes, elles-mêmes nommées **vésicules recouvertes** ; leur diamètre est de 0,1 à 0,2 µm. La fabrication d'une vésicule à partir d'un puits est très rapide : environ une minute ; par la suite, la vésicule perd rapidement son revêtement dont le rôle, on le verra plus loin, est d'engendrer une surface sphérique à partir d'une surface plane. Dans les cellules en culture, on estime que la surface occupée par les puits recouverts représente 2 % de celle de la membrane cytoplasmique ; 2 500 vésicules recouvertes environ s'y forment toutes les minutes.

Le mécanisme moléculaire de la vésiculisation est maintenant bien connu ; il met en œuvre essentiellement une protéine appelée **clathrine**, qui a la propriété de s'organiser en édifices supramoléculaires en forme de réseau hexagonal. La technique de cryofracture/cryodécapage profond montre d'extraordinaires images de formation de ces vésicules recouvertes, en dessous de la membrane plasmique, à des stades variés. La clathrine forme des complexes trimériques ayant l'allure d'une croix à trois branches : les **triskelions**, édifices formés de trois longues chaînes polypeptidiques associées à trois plus petites. En raison de cette forme géométrique, ces derniers ont la possibilité d'engendrer des réseaux hexagonaux plans pouvant se coller à la surface interne de la bicouche lipidique (voir *figure* 6.18) ; il s'agit même en fait d'un réseau à trois dimensions car l'extrémité de chaque branche plonge vers l'intérieur, d'où l'épaisseur importante de cette structure, visible en microscopie. La déformation contrôlée de ce réseau plan, par apparition de pentagones qui induisent une courbure, conduit à la formation d'une corbeille, puis d'une sphère (se souvenir qu'un ballon de football est formé d'un assem-

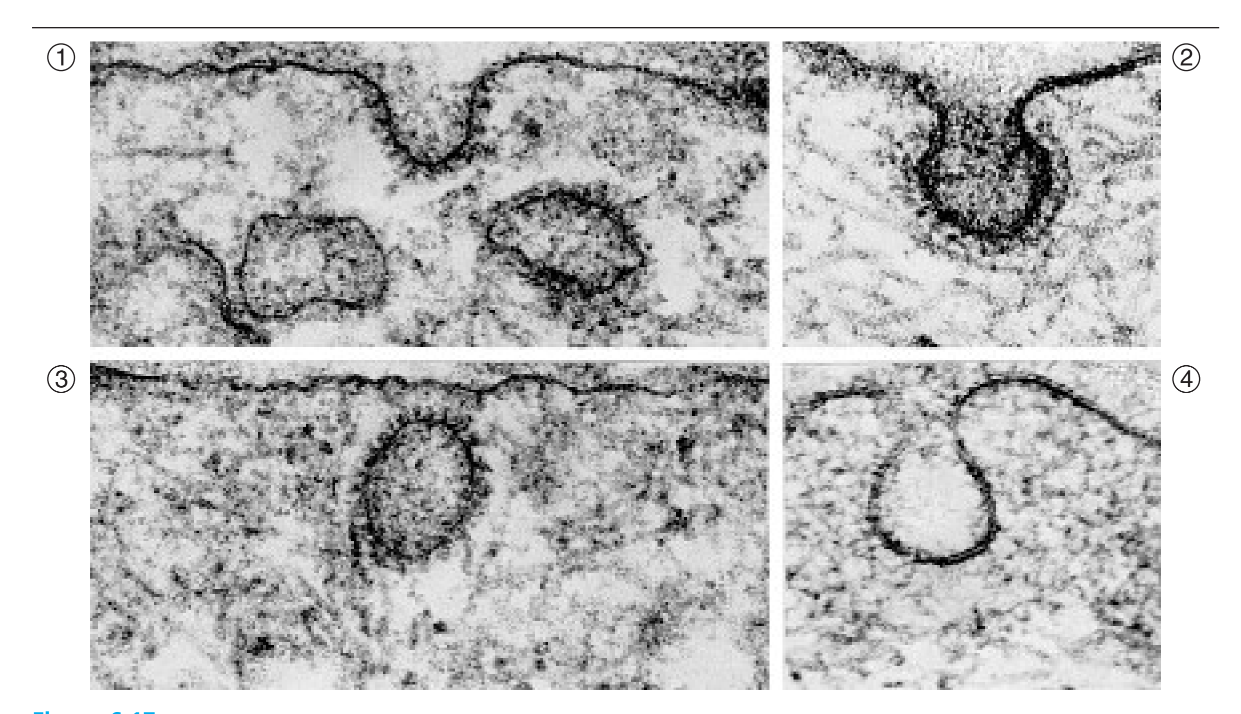


Figure 6.17

Micrographies électroniques illustrant le phénomène d'endocytose

(1) et **(2)** Vésicules d'endocytose en cours de pincement, recouvertes d'une enveloppe de clathrine. **(3)** Vésicule recouverte refermée, sous la surface de la membrane plasmique, avant qu'elle ait perdu son feutrage protéique. **(4)** Vésicule non recouverte de clathrine, à titre de comparaison.
Grossissement × 100 000. (Labo BG, Orsay).

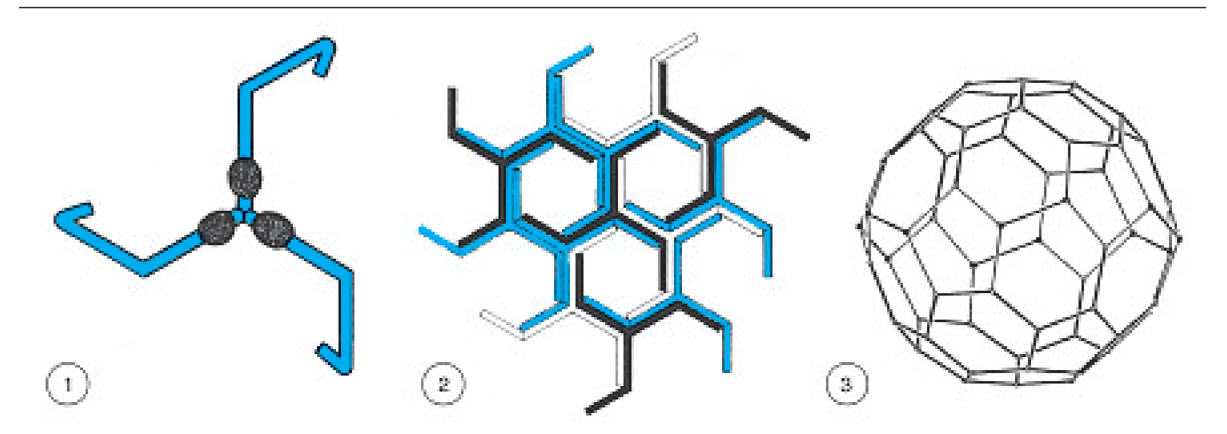


Figure 6.18

Schémas montrant l'organisation et le rôle de la clathrine

(1) Structure tripartite d'une molécule de clathrine, formée de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères (triskélion). **(2)** Agencement des triskélions de clathrine pour former un réseau hexagonal plan. **(3)** Organisation d'une cage sphérique formée d'hexagones et de pentagones, comme celles qui englobent les vésicules d'endocytose.

blage précis d'hexagones et de pentagones). Le morceau de membrane emprisonné dans une telle cage, qui se déforme peu à peu, se referme automatiquement pour donner une vésicule close.

La clathrine n'est pas la seule protéine structurale trouvée dans les puits et vésicules recouverts ; d'autres molécules interviennent pour associer la clathrine à la bicouche et aider à la capture spécifique de certains récepteurs membranaires (*adaptine* ; voir plus loin), qui seront intériorisés en même temps. Les phénomènes énergétiques et la multitude de contrôles nécessairement associés à toute

cette dynamique ne sont pas encore complètement élucidés. Ce mode de formation de vésicules est généralisable à d'autres territoires membranaires que la membrane cytoplasmique ; nous verrons en effet que le bourgeonnement de certaines vésicules au niveau du réseau membranaire interne dit « transgolgien », se déroule de la même façon, grâce à des cages de clathrine.

Il faut enfin signaler que certaines formes d'endocytose se déroulent sans l'intervention de la clathrine. On peut citer le cas des cellules endothéliales (décrites plus loin), ou celui de l'endocytose de la thyroglobuline, lors de la production de la thyroxine par les thyréocytes (voir chapitre 7).

3.2.2. Intervention de récepteurs membranaires au cours de l'endocytose

Chaque vésicule intériorisée emporte évidemment dans sa lumière un peu du milieu extérieur à la cellule ; de l'eau, des ions, des molécules dissoutes sont ainsi absorbés. C'est ce qui se produit dans le cas des cellules endothéliales, qui absorbent ainsi des gouttelettes dont la composition est représentative de leur milieu extérieur ; on parle alors d'**endocytose de phase liquide**.

Cependant, l'efficacité réelle du mécanisme de pinocytose tient à la possibilité pour la membrane plasmique de concentrer considérablement certains composés à importer, grâce à leur adsorption spécifique au niveau de **récepteurs membranaires**, qui les prennent en charge. Il s'agit de protéines intrinsèques possédant un domaine extracellulaire capable de reconnaître et de fixer solidement le produit à absorber (ligand). Une fois chargés, ces récepteurs se rassemblent au niveau des puits recouverts et ils sont évidemment intériorisés en même temps que le reste de la membrane, lors de la formation des vésicules ; on parle alors d'**endocytose par l'intermédiaire de récepteurs**. Ce mécanisme est plus de 1 000 fois plus efficace que l'endocytose simple de phase liquide, et même des substances très diluées dans le milieu extérieur peuvent être concentrées et ingérées en grande quantité par les cellules. Un seul puits recouvert peut en effet rassembler environ 1 000 récepteurs, appartenant le plus souvent à des types différents.

Un des exemples classiques de ce mécanisme est celui de l'importation du **cholestérol** par les cellules animales. Ce constituant hydrophobe, qui entre dans la composition des membranes cellulaires (voir chapitre 5), est essentiellement d'origine exogène. Fabriqué en grande partie par le foie, il est transporté dans le sang sous forme de particules complexes nommées **lipoprotéines de faible densité** (LDL = *low density lipoproteins*). L'organisation d'une telle particule, d'environ 20 nm de diamètre, est donnée dans la *figure* 6.19. Une protéine de haut poids moléculaire organise l'ensemble et lui donne son identité. En effet, cette molécule est précisément reconnue par un récepteur appartenant à la membrane plasmique des cellules animales : le **récepteur des LDL** ; il s'agit d'une glycoprotéine à traversée unique (de 839 acides aminés), pourvue d'un volumineux domaine extracellulaire. Au moyen de son site de liaison tourné vers l'extérieur, chaque récepteur membranaire capte une particule ; ensuite, grâce à la fluidité membranaire, les récepteurs chargés s'associent aux puits recouverts de clathrine, s'y concentrent et sont ainsi intériorisés (voir *figure* 6.20).

De très nombreuses espèces protéiques sont fixées et accumulées de cette manière par les cellules : la transferrine (protéine transportant le fer dans le sang), des protéines de réserve (dans le cas des ovocytes ; voir chapitre 7), les immunoglobulines, de nombreuses hormones… On connaît plusieurs dizaines de récepteurs différents fonctionnant selon ce principe. L'intensité de l'endocytose est estimée par l'utilisation de molé-

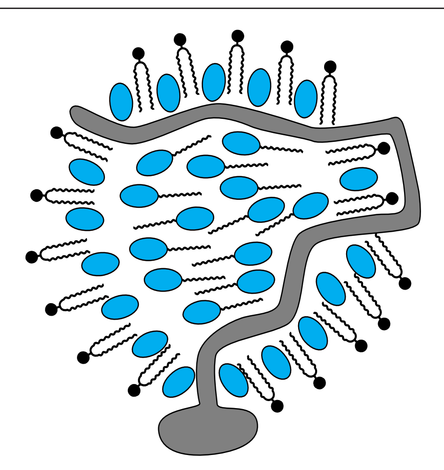


Figure 6.19

Schéma de l'organisation d'une particule lipoprotéique de faible densité (LDL)

Chaque particule contient un noyau hydrophobe d'environ 1 500 molécules de cholestérol estérifié par un acide gras (linoléique). Sa surface est formée d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol. Une grosse molécule de protéine hydrophobe (apolipoprotéine B, 500 kDa) est ancrée dans la surface de la particule.

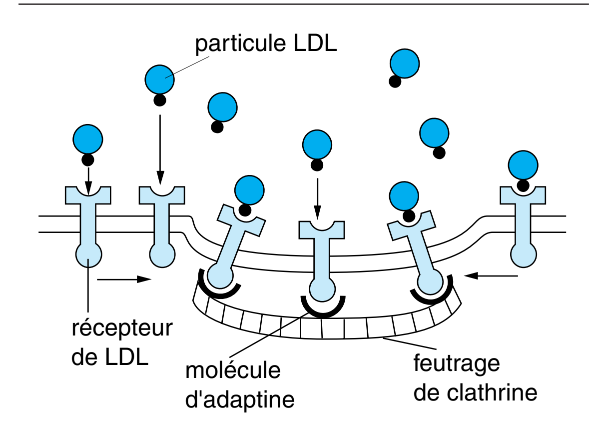


Figure 6.20

Rôle des récepteurs protéiques des LDL

Ils jouent un rôle dans la reconnaissance et la capture de ces particules, puis leur concentration au niveau des puits recouverts, et donc dans l'endocytose qui en découle. Les molécules d'adaptine fixent chaque récepteur au feutrage de clathrine sous-jacent.

cules marquées qui, soit restent dissoutes dans la phase liquide, soit suivent la voie des récepteurs. Les deux méthodes donnent des résultats convergents et démontrent que des fibroblastes en culture intériorisent leur membrane plasmique à un taux élevé : ces cellules «boivent» plus de l'équivalent de leur propre volume en 24 h et ingèrent le double de la surface de leur membrane limitante en 1 h ! Ceci pose la question des mécanismes de renouvellement de cette membrane, dont la surface reste inchangée malgré l'endocytose. Nous verrons en fait que les cellules recyclent vers leur surface les «morceaux» de membrane utilisés pour la formation des vésicules, plutôt que d'en fabriquer sans cesse de nouveaux composants.

En conclusion, contrairement à l'impression statique que suggèrent souvent les images fournies par la microscopie électronique, il faut concevoir la membrane plasmique comme une structure très dynamique et en perpétuel renouvellement.

3.2.3. Devenir des molécules absorbées et de leurs récepteurs. Le compartiment endosomal

Dès qu'elles sont formées, les vésicules d'endocytose sont dénudées par perte de la clathrine, puis elles fusionnent avec un système membranaire clos situé sous la membrane plasmique et s'enfonçant assez profondément dans la cellule : le **compartiment endosomal**. La simple analyse cytologique ne permet pas d'identifier clairement ce compartiment très polymorphe, qui peut être confondu avec de nombreuses autres structures membranaires dans la cellule. Pour le visualiser, il faut utiliser un ligand marqué pouvant être intériorisé et suivi au cours de son cheminement dans la cellule : protéines marquées grâce à la ferritine ou l'or colloïdal, ou bien enzymes permettant la cytoenzymologie telles que la peroxydase…

Le compartiment endosomal est formé d'un réseau complexe de tubules et de vésicules au sein duquel on distingue des **endosomes** périphériques (proches de la membrane plasmique) et des endosomes internes (périnucléaires). Bien que parfois proche de l'appareil de Golgi, cet organite en est clairement distinct. Sa caractéristique biochimique majeure est la présence d'un contenu à pH acide (5-6), les endosomes les plus internes étant plus acides que ceux qui sont périphériques. Cependant, à la différence des **lysosomes**, ce compartiment ne contient pas d'enzymes hydrolytiques à pH optimum acide (voir chapitre 7). Cette richesse en protons est liée à la présence d'une pompe H^+ ATP dépendante dans la membrane des endosomes (voir plus haut) ; on trouve une pompe semblable dans les membranes lysosomales.

Le rôle des endosomes peut être illustré en prenant l'exemple des LDL. Dans l'environnement acide de ces vésicules, le complexe récepteur/ligand se dissocie (à la suite d'une modification de conformation du premier) et les particules LDL sont libérées dans la lumière. Selon des mécanismes encore mal identifiés, un phénomène capital de tri s'effectue alors, de sorte que les récepteurs libérés se concentrent en un endroit précis de la membrane de l'endosome, où se produit ensuite un phénomène de bourgeonnement puis de vésiculisation secondaire. Les vésicules ainsi formées fusionnent avec la membrane plasmique, ce qui entraîne le retour des récepteurs à la surface cellulaire et leur permet de servir des centaines de fois. Le contenu des endosomes, quant à lui, est dirigé *via* d'autres vésicules, vers les lysosomes où aura lieu la digestion. Dans le cas des LDL, les phospholipides et les esters de cholestérol y sont attaqués et les produits de dégradation, dont le cholestérol libre, diffusent à travers la membrane, gagnent le hyaloplasme et sont disponibles pour la cellule ; les acides aminés issus de la digestion de la protéine de liaison sont aussi récupérés (voir *figure* 6.21).

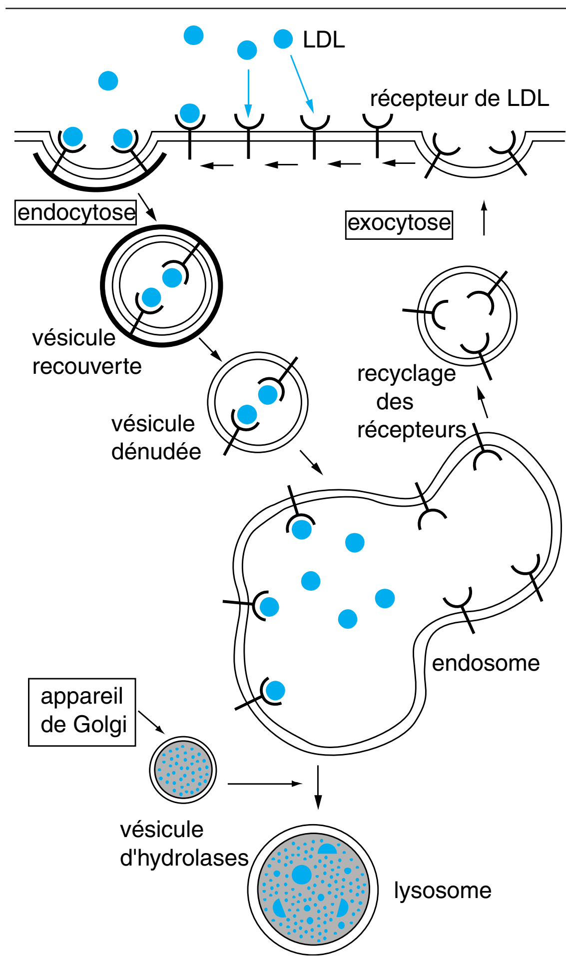


Figure 6.21

Rôle des endosomes dans le recyclage des récepteurs des LDL et leur retour vers la membrane cytoplasmique

Après fusion des vésicules d'endocytose avec le compartiment endosomal, les récepteurs se séparent de leur ligand. Les premiers sont rassemblés et réexpédiés vers la membrane plasmique, tandis que les particules de LDL sont dirigées vers le compartiment lysosomal.

Ce système est régulé de la façon suivante : si la cellule absorbe trop de cholestérol, on observe d'une part, l'arrêt de la synthèse endogène de cette molécule et, d'autre part, l'arrêt de la synthèse des récepteurs protéiques des LDL. On a donc une boucle régulatrice à deux niveaux (ou à double-détente), puisque des réponses rapide puis lente sont mises en jeu, qui maintiennent le taux de cholestérol intracellulaire à un niveau fixe. Cet exemple de recyclage des récepteurs s'applique aussi à ceux de la transferrine, mais selon des modalités plus complexes. On connaît cependant des cas pour lesquels les récepteurs ne sont pas renvoyés vers la membrane plasmique : la raison en est souvent l'impossibilité pour le complexe récepteur/ligand de se dissocier à pH acide, et c'est donc l'ensemble qui est dirigé vers les lysosomes où tous deux sont détruits.

Plusieurs maladies génétiques conduisent, chez l'Homme, à la production de récepteurs défectueux des LDL ; les cellules ne pouvant donc plus prélever efficacement le cholestérol sanguin, on observe une cholestérolémie élevée, dont les conséquences sont souvent graves (voir l'encart biomédical suivant).

ENCART BIOMÉDICAL

Les hypercholestérolémies familiales

Ces maladies héréditaires touchent environ un individu sur 500 ; elles sont dues à diverses catégories de mutations affectant les récepteurs des LDL. Les homozygotes pour les allèles mutants ont des taux de cholestérol sanguin très élevés, ce qui conduit à une athérosclérose aiguë et précoce ; ces patients meurent souvent d'infarctus en bas âge. Trois principaux types de mutations ont été identifiés : 1) les récepteurs font complètement défaut, 2) ils sont présents en nombre normal, mais leur domaine extracellulaire de fixation du ligand est modifié, de sorte que les particules LDL sont peu ou pas fixées, 3) ils fixent parfaitement les LDL, mais ne parviennent pas à se rassembler dans les puits recouverts, et ne sont donc pas intériorisés, car leur domaine intracellulaire de liaison au feutrage de clathrine est modifié.

Une séquence précise de quatre acides aminés appartenant au court domaine intracellulaire (50 acides aminés) de ce récepteur a été identifiée, dont le rôle est crucial pour l'intériorisation. Cette séquence consensus est retrouvée dans de nombreux autres récepteurs. De plus, son implication a été démontrée directement par des expériences de génie génétique : toute protéine membranaire à laquelle on « greffe » cette courte séquence devient automatiquement capable d'être capturée par des puits recouverts de clathrine, puis intériorisée, à la manière d'un récepteur normal.

3.2.4. Phénomène de transcytose

Il s'agit d'un phénomène d'endocytose dans lequel les vésicules et leur contenu ne sont pas dirigés vers le compartiment lysosomal, mais

envoyés vers un autre endroit de la membrane plasmique. Les cellules endothéliales, par exemple, qui sont les cellules aplaties et très fines tapissant les vaisseaux sanguins, sont l'objet d'une endocytose de phase liquide intense, permettant de faire passer rapidement des éléments du plasma sanguin dans le milieu intérieur, par exocytose sur la face opposée de la cellule. Dans ce cas particulier, la vésiculisation de la membrane plasmique ne met visiblement pas en jeu le feutrage très caractéristique dû à la clathrine (voir *figure* 6.22). Chez le rat nouveau-né, le transport des anticorps contenus dans le lait maternel, à travers l'épithélium intestinal, met aussi en jeu ce phénomène de **transcytose**. Des récepteurs spécifiques, fixant les anticorps sur la face absorbante des entérocytes, sont ici endocytés par des vésicules recouvertes de clathrine. Après passage à travers les endosomes, l'exocytose a lieu sur la face baso-latérale de la cellule, au niveau de laquelle les anticorps se détachent de leurs récepteurs.



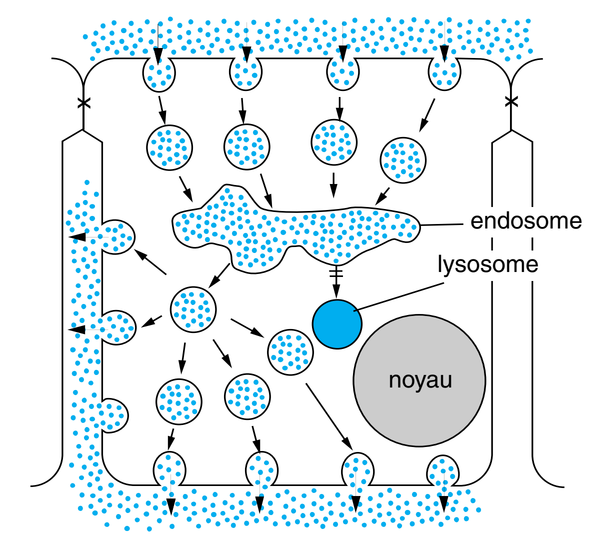


Figure 6.22

Cliché montrant l'intense formation de vésicules d'endocytose non recouvertes et schéma simplifié illustrant le phénomène de transcytose

Ces vésicules sont ici impliquées dans la transcytose au sein des cellules endothéliales de capillaires sanguins. Noter que les vésicules d'endocytose ne sont pas dirigées vers les lysosomes, mais directement envoyées vers une autre membrane de la cellule, avec laquelle elles fusionnent.
Grossissement × 60 000. (Labo BG, Orsay).

3.3. Phénomène de phagocytose

C'est le mécanisme par lequel des particules de grande ou très grande taille sont absorbées par les cellules : les vésicules ainsi formées sont appelées **phagosomes**. Après fusion avec les lysosomes primaires, elles donneront les **phagolysosomes**, au sein desquels le matériel ingéré sera dégradé ; cette question sera traitée lors de l'étude des lysosomes (chapitre 7). La phagocytose est une forme d'alimentation courante chez les Protistes et chez de nombreux Invertébrés inférieurs : Cnidaires, Éponges…, qui possèdent des cellules spécialisées pratiquant une digestion intracellulaire. Chez les Vertébrés inférieurs, ce phénomène existe dans le cas de certains Poissons, pour lesquels la digestion dans le tractus digestif n'est pas totalement extracellulaire (alors qu'elle est la règle chez les Mammifères, par exemple). Chez les Animaux supérieurs, la phagocytose est réservée à certains types de cellules sanguines spécialisées dans la défense de l'organisme ou dans l'élimination des cellules sénescentes, endommagées ou mortes ; le mécanisme membranaire impliqué dans ce processus sera décrit dans le chapitre 7.

Contrairement à la pinocytose, qui se produit de façon continue (phénomène constitutif), il s'agit d'un mécanisme induit et contrôlé, car des signaux doivent être envoyés vers l'intérieur de la cellule afin que les éléments assurant l'enveloppement cytoplasmique se mettent en place. La cytologie montre que des éléments du **cytosquelette** contribuent en effet à ce phénomène car un réseau dense d'actine, excluant tous les autres organites du hyaloplasme, entoure les phagosomes ; en outre, les drogues qui empêchent la polymérisation de l'actine, telles que la cytochalasine (voir chapitre 11), inhibent la phagocytose et non la pinocytose. On pense que la clathrine pourrait, dans une certaine mesure, intervenir aussi dans ce processus d'absorption. Le déclenchement de la phagocytose est sous la dépendance de stimuli chimiques ; en effet, si on cultive des Protozoaires ciliés, tels que *Tetrahymena*, dans un milieu de culture contenant uniquement des petites molécules organiques, ils

ne forment pas de vacuoles digestives. L'apparition de ces organites n'a lieu que si on ajoute des polypeptides à ce milieu. De même, les leucocytes qui phagocytent les hématies ne s'attaquent qu'aux cellules âgées ou mortes, mais pas à celles jeunes et en «bonne santé» ; le mécanisme de cette reconnaissance n'est pas encore connu.

3.4. Phénomènes d'exocytose et de bourgeonnement

3.4.1. Exocytose

Toutes les cellules eucaryotiques ont la faculté de sécréter divers composés dans le milieu extérieur. Ceux-ci ont plusieurs destinées : soit ils restent étroitement accrochés à la membrane plasmique (glycocalyx), soit ils constituent une matrice extracellulaire emplissant les espaces libres entre les cellules, soit ils sont émis dans le milieu intérieur (hormones) ou dans le tractus digestif (enzymes)…, si on se limite aux Animaux ! Dans ces cellules, ce sont des vésicules spécialisées de transport qui acheminent leur contenu vers la membrane plasmique, ainsi que de nouveaux composants de la membrane elle-même, à la suite d'un phénomène de fusion des bicouches lipidiques.

L'origine de ces molécules et le phénomène d'**exocytose** seront décrits en détail lors de l'étude de la synthèse protéique et du transit intracellulaire de ces molécules, dans le chapitre 9. Nous nous contenterons ici d'annoncer les deux grandes voies que l'on distingue classiquement :

– la **voie de sécrétion constitutive**, par laquelle certaines protéines sécrétées ou membranaires, ainsi que des phospholipides, sont continuellement acheminés vers la membrane plasmique, au moyen de petites vésicules ;
– la **voie de sécrétion provoquée**, dans laquelle des vésicules de stockage sont mises en œuvre ; celles-ci ne fusionnent avec la membrane que lorsque la cellule a reçu un signal extracellulaire bien précis.

Nous nous contenterons ici d'illustrer ce phénomène par un exemple d'exocytose provoquée un peu particulier, qui complétera les exemples classiques développés dans le chapitre 9, à savoir la cellule de pancréas exocrine ou la cellule caliciforme à mucus de l'intestin (voir encart suivant).

Encart biomédical

Sécrétion de l'histamine et réaction inflammatoire

Les **mastocytes** sont des cellules particulières de la lignée sanguine, situées dans le tissu conjonctif, qui fabriquent et libèrent l'**histamine** (un dérivé de l'acide aminé histidine) ; celle-ci est stockée dans de grosses vésicules contenant également des protéoglycanes, qui la fixent. Ce composé est responsable de la réaction inflammatoire : certains stimuli (infection locale, lésion tissulaire…) provoquent la libération rapide, par exocytose, du contenu de ces vésicules dans les espaces extracellulaires, ce qui a pour effet de dilater les vaisseaux sanguins. La libération d'histamine est la cause de la rougeur locale observée au niveau de la peau et des démangeaisons, dans le cas d'une irritation ou d'une piqûre d'insecte… ; elle est aussi responsable des réactions allergiques : asthme, rhume des foins, urticaire… Une conséquence importante de l'augmentation de perméabilité des vaisseaux est le passage dans les tissus de protéines sériques (albumine, anticorps…) et de cellules défensives (globules blancs phagocytaires).

On montre sur ces cellules que le mécanisme de l'exocytose n'implique pas une réponse globale de la cellule, car celle-ci ne se produit pas nécessairement au niveau de toute leur surface membranaire. Ceci n'est obtenu que lorsque le ligand qui stimule le phénomène, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, peut agir simultanément sur toute la surface cellulaire (lorsqu'il est dissous dans le milieu, par exemple). Quand le stimulus n'est appliqué que sur une partie de cette surface (par exemple si le ligand a été adsorbé sur une bille de verre ou de plastique), c'est à ce niveau seulement que se fera l'exocytose. Après réception du signal, la réponse intracellulaire est donc très localisée : des territoires isolés de membrane réagissent indépendamment de leurs voisins. Cette propriété rappelle un peu ce qui sera dit plus tard pour la phagocytose (voir chapitre 7).

Pour conclure ce point, il faut se souvenir que toute exocytose doit être compensée par une endocytose, afin que la surface membranaire reste constante ; c'est une des fonctions permanentes des multiples vésicules d'endocytose que la cytologie met en évidence. On mesure l'importance du pro-

cessus lorsqu'on sait par exemple qu'une cellule pancréatique, stimulée pour sécréter ses enzymes digestives, libère brutalement l'équivalent d'environ 900 μm^2 de membranes (celles entourant les granules de zymogène ; voir chapitre 9) au niveau de la membrane plasmique de sa face apicale ; or, la surface de celle-ci (30 μm^2 environ) reste évidemment inchangée au cours du processus !

3.4.2. Bourgeonnement

Le **bourgeonnement** est défini comme l'émission d'une vésicule à l'extérieur d'un compartiment membranaire ; il représente en fait exactement l'inverse de l'endocytose. Ce mécanisme est très développé au sein des cellules eucaryotiques, où il constitue un moyen capital de transport de molécules d'un compartiment à un autre. Les vésicules ayant bourgeonné à partir d'un compartiment donneur fusionnent avec un compartiment receveur, à la manière de l'exocytose décrite plus haut. C'est le cas, par exemple, de la formation des **vésicules de transition** qui assurent un flux de membranes du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (sacs cis-golgiens), des vésicules transitant entre les saccules golgiens, ou bien des vésicules d'exocytose émises par le réseau transgolgien (voir chapitre 9).

En fait, il ne se produit jamais de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique, à l'exception des phénomènes de production des **particules virales**, et d'un cas très particulier de sécrétion, décrit plus loin. Il existe en effet, autour de certains Virus (qui sont des entités non cellulaires ; voir chapitre 1), une structure membranaire typique dérivée de la membrane plasmique de la cellule-hôte, liée à leur mode de sortie à travers celle-ci (voir chapitre 15). Dans les cellules des glandes mammaires des Mammifères, la sécrétion des globules graisseux du lait implique un mécanisme très particulier, dit **apocrine** ; les gouttelettes de triglycérides accumulées dans le hyaloplasme sont en effet progressivement enveloppées dans des évaginations de la membrane plasmique qui finissent par se pincer et se séparer de la cellule. En dehors de cet exemple de bourgeonnement typique, la production et l'émission plus ou moins anarchique de vésicules par la membrane plasmique semblent être, au contraire, la manifestation de phénomènes pathologiques et annonciateurs d'une fin proche.

3.5. Passage direct de protéines à travers la membrane cytoplasmique chez les Bactéries

Il existe, chez les Bactéries, une possibilité de franchissement de la membrane cytoplasmique par des protéines en cours de synthèse (ou après celle-ci). Ces micro-organismes ont en effet la capacité à sécréter des macromolécules dans le milieu extérieur, mais le mode de sécrétion mis en œuvre est très particulier et fondamentalement différent de l'exocytose qu'on vient de décrire chez les Eucaryotes. Les protéines sont en effet : 1) soit littéralement «injectées» à travers la bicouche, au cours de leur polymérisation par des ribosomes accolés à la face interne de la membrane plasmique, 2) soit progressivement «dissoutes» dans la bicouche, grâce à certains de leurs domaines hydrophobes, avant d'être reconstituées puis rendues fonctionnelles à l'extérieur de la cellule. Nous analyserons en détail le premier de ces deux mécanismes lors de l'étude de la synthèse des protéines au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, chez les Eucaryotes, car celui-ci est basé sur des principes similaires (voir chapitre 9).

Perspective biomédicale

La mucoviscidose

Cette maladie génétique récessive grave, car encore létale, touche les enfants et les jeunes adultes ; elle est relativement répandue en Europe et Amérique du Nord, où elle affecte environ un individu sur 2500, mais est plus rare dans les autres groupes humains. Cette proportion élevée d'homozygotes s'explique par le fait qu'un individu sain sur 25 est hétérozygote pour ce gène, c'est-à-dire porte une copie mutante du gène responsable de la maladie (porteurs sains).

Les manifestations cliniques de la maladie sont multiples : 1) les voies respiratoires sont encombrées par de gros paquets de mucus très difficiles à évacuer, ce qui entraîne des difficultés respiratoires ; il s'en suit également des infections chroniques des poumons conduisant à leur détérioration progressive ; 2) le tractus intestinal, le pancréas, les voies génitales et les glandes sudoripares sont également affectés. L'espérance de vie ne dépasse pas une trentaine d'années ; les progrès des traitements médicaux (la kinésithérapie, pour faciliter le drainage des voies respiratoires, les antibiotiques pour juguler les infections et les substituts d'enzymes digestives) améliorent cependant le confort des malades et augmentent significativement leur durée de vie.

De fait, toutes les fonctions touchées concernent des processus sécrétoires (mucus, enzymes, sueur), ce qui a mis les chercheurs sur la piste d'une anomalie cellulaire d'un transport membranaire. La production d'un mucus anormalement épais par les cellules épithéliales bronchiques, ou d'une sueur très salée par la peau, est en fait liée à une anomalie du transport du chlore, comme l'ont montré les cultures in vitro de cellules de patients, dès 1984. Le défaut de sortie du chlore des cellules concernées entraîne un déficit de sortie d'eau et donc une viscosité élevée des sécrétions.

Le gène responsable de la maladie (250 kbases ; 26 exons) a été identifié en 1989. Il est situé sur le bras long du chromosome 7 ; l'étude de sa séquence a montré qu'il code pour un transporteur protéique de type ABC (voir page 154). Ce canal chlore porte, dans deux domaines intracellulaires, un site de liaison à l'ATP ; son fonctionnement nécessite la phosphorylation d'un autre domaine régulateur et la fixation de deux ATP qui, après hydrolyse, permettent son ouverture. La particularité de ce transporteur ABC, par rapport à tous les autres, est qu'il est régulé par l'AMP cyclique, via une kinase évoquée plus haut.

La base moléculaire de la maladie est maintenant bien connue : plusieurs centaines de mutations dans le gène ont été identifiées, mais la mutation la plus fréquente est une délétion de trois bases conduisant à l'absence d'un acide aminé. Selon la nature et la position de la mutation, les conséquences sont plus ou moins invalidantes : dans les cas les plus graves, la protéine canal n'est pas mise en place dans la membrane plasmique (défaut d'adressage), alors que dans les formes plus légères, une protéine moins efficace que la forme normale est correctement positionnée dans la cellule. Les tests de dépistage des couples à risque sont désormais possibles grâce à l'utilisation de sondes moléculaires, et un conseil génétique est mis en place.

La thérapie génique, qui consiste à remplacer le gène défectueux par une copie normale dans les cellules, a été envisagée dès 1993 ; l'accès aux cellules déficientes des voies respiratoires supérieures est en effet aisé via des aérosols. Deux voies d'apport des gènes aux cellules sont testées : 1) la voie virale, dans laquelle des adénovirus servent de vecteurs d'ADN et apportent la copie normale du gène (intégrée à leur génome «désarmé» et, 2) la voie des liposomes qui, en fusionnant avec la membrane plasmique des cellules épithéliales bronchiques, déversent les gènes normaux qu'ils transportaient. Par ailleurs, des traitements médicaux utilisant des drogues stimulant l'ouverture d'autres canaux chlore, sont à l'étude.

RÉSUMÉ

La membrane plasmique présente l'architecture classique de toutes les membranes biologiques, mais sa structure est souvent caractérisée par une asymétrie marquée, liée à l'existence d'un revêtement polysaccharidique extracellulaire : le glycocalyx. Si cette membrane est avant tout une barrière physique entre le cytoplasme et le milieu extérieur, elle constitue aussi un lieu d'échanges intenses de matière entre ces deux compartiments.

La diffusion, qui régit tous les échanges spontanés de matière dans la nature, s'applique à ceux existant entre la cellule et son environnement. L'étude de la perméabilité des bicouches lipidiques artificielles permet d'évaluer l'importance des échanges liés à la diffusion lipophile, et fait ressortir la nécessité de protéines pour assurer le transport de la plupart des composés organiques ou des ions que les cellules doivent importer ou exporter. Le transport de l'eau, par exemple, se fait directement à travers la bicouche et au moyen de transporteurs plus ou moins spécialisés, parmi lesquels les plus récemment identifiés sont les aquaporines.

La diffusion facilitée implique des protéines porteuses dont le fonctionnement général est calqué sur celui des enzymes classiques. Les perméases sont diverses et très nombreuses ; leur rôle est fondamental car elles assurent une grande partie des échanges de petites molécules organiques entre la cellule et son milieu. Ce mode de diffusion s'applique aussi au mouvement des ions, dont les rôles sont essentiels dans de nombreuses activités cellulaires, et qui utilisent des protéines spécifiques appelées canaux ioniques. Les transporteurs actifs primaires (ou pompes) assurent uniquement le transport des ions, contre leur gradient de concentration et consomment pour cela diverses sources d'énergie, dont la plus courante est l'ATP ; certains fonctionnent avec d'autres sources d'énergie, telles que les réactions d'oxydoréduction, ou même la lumière. Les divers transporteurs actifs secondaires utilisent les gradients ioniques de Na^+ et de H^+ créés par les pompes pour transporter des composés organiques ou minéraux contre leur gradient de concentration.

Le transfert de macromolécules ou de particules vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule met en œuvre respectivement l'endocytose ou l'exocytose. Ces processus impliquent l'intervention de vésicules qui, soit se forment au niveau de la membrane cytoplasmique, en emportant un peu du milieu extérieur, soit fusionnent avec elle et s'ouvrent à l'extérieur, quand elles ont une origine interne.

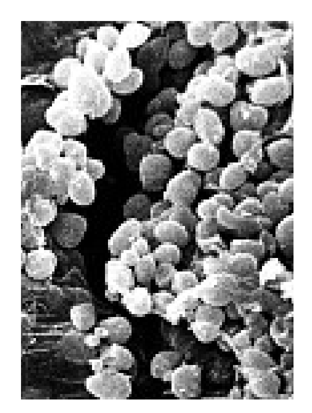
La pinocytose se réalise le plus souvent grâce à des récepteurs membranaires qui reconnaissent et captent des macromolécules spécifiques en concentration parfois très faible dans le milieu extérieur. Après l'intériorisation des vésicules portant les récepteurs chargés, le compartiment endosomal joue un rôle capital dans le devenir des particules absorbées et des récepteurs qui les ont captées. Ce compartiment trie en général ces derniers et les renvoie vers la membrane plasmique, tandis qu'il dirige les produits absorbés vers les lysosomes où une digestion intracellulaire a lieu.

La phagocytose, qui est un processus à vocation nutritive ou défensive, permet l'absorption de particules de grande taille ; elle met en jeu des mécanismes originaux. Tous ces processus traduisent un renouvellement permanent et intense de la membrane plasmique, que ne suggèrent pas la plupart des approches cytologiques.

Q R O C

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Qu'appelle-t-on «glycocalyx» ? par quelles techniques met-on en évidence cette structure ?
2. Décrire une expérience classique permettant de démontrer la fluidité de la membrane cytoplasmique des cellules animales en culture.
3. Donner et justifier la formule exprimant l'intensité d'un flux net lié au phénomène de diffusion (loi de Fick).
4. Quelles conclusions peut-on tirer des expériences historiques de OVERTON et COLLANDER, en ce qui concerne la pénétration des substances non électrolytes dans les cellules ?
5. Énoncer les principales règles régissant le transport des molécules organiques à travers les bicouches lipidiques artificielles.
6. Qu'appelle-t-on «osmose» ? dans quelles conditions observe-t-on les phénomènes nommés «plasmolyse et turgescence», dans les cellules ?
7. Qu'appelle-t-on «aquaporine» ?
8. Sur quel principe les canaux ioniques fonctionnent-ils ? combien de catégories principales de canaux connaît-on ?
9. Qu'appelle-t-on «diffusion facilitée» ? en quoi celle-ci se distingue-t-elle de la «diffusion simple» ? quelles sont les caractéristiques majeures de ces transports ?
10. Quelle est l'organisation moléculaire et le mode de fonctionnement d'un transporteur membranaire assurant une diffusion facilitée ?
11. Rappeler le principe de fonctionnement d'un transporteur actif primaire. Citer les principales pompes connues chez les Animaux et les Végétaux.
12. Qu'appelle-t-on «transporteur de type ABC», et en quoi ces molécules se distinguent-elles des autres transporteurs actifs ?
13. Pourquoi la bactériorhodopsine de *Halobacterium* est-elle une molécule remarquable au plan structural et physiologique ?
14. Rappeler le principe de fonctionnement d'un transporteur actif secondaire. Citer les plus connus de ces transporteurs.
15. Que sont les ionophores et quel est leur intérêt pour un biologiste ?
16. Par quels processus est assuré le passage des macromolécules et des particules à travers la membrane cytoplasmique chez les Eucaryotes ?
17. Qu'appelle-t-on «vésicules recouvertes» ? quel est le rôle de la clathrine dans leur formation ?
18. Donner une définition, et rappeler les principales caractéristiques des récepteurs membranaires, en prenant l'exemple de celui des LDL.
19. Qu'est-ce que la «transcytose» ? Donner un exemple de cellules où ce mode de transport est particulièrement développé.
20. Comment peut-on estimer l'intensité du flux membranaire mis en œuvre dans les cellules pratiquant l'endocytose ? quelles valeurs obtient-on pour des cellules en culture ?
21. Quelle différence de mécanisme existe-t-il entre l'exocytose et le bourgeonnement ? Donner un exemple de processus impliquant ce dernier mécanisme.
22. Qu'appelle-t-on «compartiment endosomal» ? quel est son rôle par rapport au devenir des récepteurs chargés ayant fait l'objet d'une endocytose ?



Chapitre 7

NUTRITION ET CROISSANCE DES CELLULES

Utilisation des métabolites et accumulation des réserves

La théorie de la continuité cellulaire, énoncée il y a 150 ans, implique que les cellules sont capables de croissance et de multiplication (voir chapitre 2). L'activité chimique de ces dernières consiste essentiellement dans la synthèse de nouveaux matériaux destinés à assurer le renouvellement constant de leurs constituants vieillissants, et à préparer la génération suivante. Rares sont les exemples de cellules qui se divisent sans accroître préalablement la masse de leur cytoplasme, et lorsque ce phénomène se produit, il reste limité dans le temps (voir chapitre 12). Après avoir analysé la façon dont les cellules absorbent les éléments du milieu à travers leur membrane plasmique, nous allons étudier dans ce chapitre comment elles les utilisent pour élaborer les molécules spécifiques de leurs structures et construire leur propre matière.

Il ne s'agit pas de donner ici le détail des innombrables réactions constituant le catabolisme ou l'anabolisme, mais de rappeler et surtout localiser les principales voies métaboliques, souvent universelles, dans lesquelles s'engagent les molécules simples qui servent d'aliments aux cellules. À partir de ces métabolites, que l'on appelle nutriments, les cellules tirent à la fois l'énergie et les chaînons carbonés indispensables à la synthèse de leurs macromolécules. Les voies étudiées dans ce chapitre se déroulent essentiellement au sein du hyaloplasme, bien qu'elles puissent faire intervenir ponctuellement, chez les Eucaryotes, des organites complexes tels que les mitochondries ou les plastes. Deux autres compartiments majeurs impliqués dans tous les phénomènes liés au stockage et à l'utilisation des métabolites, seront aussi étudiés à cette occasion : les lysosomes et les vacuoles.

Qu'il s'agisse de cellules osmotrophes ou phagotrophes, la fourniture en molécules ou particules alimentaires n'est pas toujours assurée de façon constante. Un des mécanismes permettant la survie des organismes consiste alors dans l'accumulation de réserves de matières généralement organiques, parfois minérales, le plus souvent sous forme de macromolécules ; celles-ci sont utilisables en période de disette, après dégradation. Dans le cas des êtres unicellulaires, la disponibilité en aliments est essentiellement soumise aux aléas de l'environnement et chaque cellule a l'aptitude à accumuler des réserves. Chez les organismes complexes, seuls certains tissus sont spécialisés dans cette fonction de stockage, ainsi que dans la redistribution des produits de dégradation. Après avoir décrit les différentes structures plus ou moins spécialisées, représentant des molécules de réserve au sein des cellules, nous étudierons brièvement les mécanismes biochimiques de leur synthèse et de leur mobilisation.

1. UTILISATION DES NUTRIMENTS POUR LA CROISSANCE CELLULAIRE

Chez les organismes hétérotrophes **osmotrophes**, les métabolites de base : sucres et acides aminés, sont déjà « tout faits » quand ils sont absorbés par les cellules grâce aux transporteurs membranaires signalés dans le chapitre précédent ; il suffit donc à celles-ci de les repolymériser pour fabriquer des macromolécules spécifiques. Dans le cas des **phagotrophes**, les particules ou les macromolécules absorbées doivent être décomposées en molécules simples, en général par hydrolyse.

En revanche, les autotrophes fabriquent de toutes pièces leurs métabolites à partir des éléments minéraux du milieu : les sucres simples, fournis par la photosynthèse, constituent les chaînons carbonés servant de base pour fabriquer, entre autres, des acides aminés, après fixation de NH_3 (par amination ou transamination). Dans tous les cas, les nutriments peuvent aussi provenir des réserves que les cellules ont accumulées, en période de surabondance, sous forme de macromolécules.

Les animaux obtiennent les molécules nécessaires à la construction de leurs cellules (sucres simples, acides aminés, acides gras, …) à partir des aliments qu'ils absorbent et qu'ils digèrent. Ils sont aussi capables de synthétiser, grâce à leur équipement enzymatique, un certain nombre de ces molécules à partir des chaînons carbonés simples (acétyl, par exemple) que leur métabolisme élabore. Cependant, ne sachant pas fabriquer la totalité des molécules dont leurs cellules ont besoin, ces organismes ont des exigences absolues et spécifiques en un certain nombre de substances organiques que l'alimentation doit leur apporter. C'est le cas pour trois catégories de composés : les acides aminés essentiels, les acides gras essentiels et les vitamines (voir encart biomédical suivant).

Les mécanismes moléculaires de polymérisation des protéines et des acides nucléiques à partir de leurs monomères sont traités respectivement dans les chapitres 4 et 12.

ENCART BIOMÉDICAL

Les vitamines et autres nutriments essentiels

On a identifié, parmi les exigences alimentaires de l'Homme, huit acides aminés essentiels : Lys, Val, Leu, Ileu, Mét, Phé, Thr et Try. Si une nourriture d'origine animale les fournit tous, aucun aliment végétal ne contient les huit ensemble. Dans un régime à base végétale, il faut associer judicieusement les plantes afin qu'elles complètent leurs apports. Les céréales sont pauvres en lysine et en isoleucine, alors que les légumineuses sont pauvres en méthionine et tryptophane. Dans toutes les sociétés traditionnelles anciennes, les alimentations, faiblement carnées, étaient équilibrées en acides aminés : maïs et haricots en Amérique du Sud, blé et pois chiches en Afrique du Nord, riz et soja en Asie, par exemple (une céréale et une légumineuse).

Si nous sommes capables de fabriquer la majorité de nos acides gras, certains doivent absolument être fournis par notre alimentation. Les deux acides gras essentiels sont l'acide linoléique et l'acide α linolénique (tous deux à 18 carbones et poly-insaturés, notés respectivement $\omega6$ et $\omega3$). Ils sont abondants dans les huiles végétales : colza, tournesol, maïs, noix, … Ces molécules interviennent dans la constitution des phospholipides membranaires et de certaines hormones ; leur rôle est donc primordial.

Un autre groupe de molécules essentielles est représenté par les vitamines, dont nos besoins sont infimes, très inférieurs à ceux des molécules précédentes. Elles entrent en général dans la constitution des coenzymes, nécessaires au fonctionnement de nombreuses enzymes ; on en compte 15. Certaines sont des donneurs ou des accepteurs de groupements chimiques, d'autres interviennent dans des processus d'oxydoréduction. A titre d'exemples, on citera : la flavine (vit. B2), qui entre dans la constitution du FAD et du FMN, l'acide nicotinique (vit. B3), que l'on trouve dans le NAD+ ou le NADP+, l'acide pantothénique (vit. B5) trouvé dans le Coenzyme A, etc. Cette liste varie selon les espèces animales ; l'acide ascorbique, par exemple (vit. C) est fabriqué par la plupart des Mammifères, mais pas par l'Homme et les singes.

1.1. Dégradation des glucides au sein du hyaloplasme

Les glucides constituent le nutriment énergétique par excellence ; leur dégradation permet la formation des liaisons riches trouvées dans l'ATP, qui seront utilisées à tous les niveaux du métabolisme et des activités cellulaires. La **glycolyse** et la **voie des hexoses-monophosphates** constituent le cœur du catabolisme, mais ces voies assurent aussi d'autres fonctions importantes ; elles fournissent en particulier des métabolites intermédiaires qui participent à l'élaboration des constituants macromoléculaires des cellules (anabolisme). Nous ne rappelons ici que les données essentielles de biochimie sur le sujet, en mettant l'accent sur les aspects cellulaires, et plus spécialement les compartiments mis en jeu chez les Eucaryotes.

1.1.1. La glycolyse et la fourniture d'énergie. Les fermentations

La glycolyse est une voie pratiquement universelle dans le monde vivant ; elle consiste en une série de réactions qui convertissent une molécule de **glucose** ($C_6 H_{12} O_6$) en deux molécules d'**acide pyruvique** (CH_3 CO COOH), avec production simultanée d'ATP. Ce système fonctionne aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, mais la destinée du pyruvate diffère selon la présence ou l'absence de O_2. Dans le premier cas, sa dégradation est complète, par oxydation en CO_2 et H_2O, après prise en charge par le cycle de Krebs et les processus de phosphorylation oxydative : c'est la **respiration** ; chez les Eucaryotes, celle-ci se déroule au sein des mitochondries (voir chapitre 10). Dans le deuxième cas, le pyruvate sert d'accepteur final d'électrons, ce qui est à l'origine de **fermentations** variées. Ces processus de dégradation so nt très incomplets, mais ils permettent le recyclage des coenzymes réduits, indispensables au déroulement continu de la glycolyse.

Cette voie est peut-être la plus ancienne des voies du métabolisme énergétique, car les premiers organismes sont apparus sur la Terre alors que l'atmosphère ne contenait pas encore d'O_2. Dans des conditions aérobies, cette séquence dégradative est devenue une simple phase préparatoire à l'oxydation complète du glucose, beaucoup plus efficace au plan du rendement énergétique ; elle reste cependant un système de sécurité chez la plupart des cellules, lorsque l'O_2 fait défaut pour des périodes brèves.

• On distingue dans la glycolyse dix étapes biochimiques allant du glucose à l'acide pyruvique (ou pyruvate) qui se déroulent toutes en phase soluble, dans le hyaloplasme des cellules procaryotiques ou eucaryotiques (voir *figure* 7.1). Cette séquence de réactions, dont tous les intermédiaires sont des composés phosphorylés, comprend deux grandes périodes. La première (trois étapes) comprend des réactions de phosphorylation du glucose, après consommation d'ATP ; la deuxième conduit à la formation de liaisons à haut potentiel énergétique, puisque deux molécules d'ATP sont synthétisées à partir de chaque triose-phosphate obtenu dans la phase précédente. Il semble paradoxal de commencer par consommer de l'ATP, pour en produire ensuite ; en fait, cette stratégie conduit à fabriquer un composé activé : le fructose 1-6 diphosphate, qui est aisément clivé en deux moitiés, chacune étant phosphorylée.

La première réaction de la deuxième phase est une étape cruciale d'oxydoréduction mettant en jeu le transporteur d'électrons nommé NAD^+ (réduit en NADH) et du phosphate inorganique, et permettant l'obtention du composé nommé **1-3 bisphosphoglycérate** (oxydation phosphorylante). Ce dernier, qui possède un potentiel de transfert standard du groupe phosphate très élevé, est une molécule «riche en énergie» permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP. Un deuxième composé riche en énergie, formé dans la glycolyse, est le **phosphoénolpyruvate**, qui est lui aussi utilisé pour la formation d'une molécule d'ATP. Ces deux réactions spécifiques de la glycolyse sont fondamentalement différentes de celles qui sont à l'origine de l'ATP dans les mitochondries, en aérobiose (voir chapitre 10). On parle ici de **phosphorylation au niveau du substrat**, pour traduire l'idée que ce sont des mécanismes enzymatiques banals qui sont en jeu, c'est-à dire ne nécessitant pas de structures cellulaires particulières, ni d'oxygène libre.

L'observation majeure, après cette analyse, est que la dégradation du substrat initial est très incomplète, puisque celui-ci n'a subi en fait qu'un clivage et deux déshydrogénations ; comme la deuxième phase de la glycolyse conduit à la formation de deux ATP par triose-phosphate obtenu au cours de la première (2 × 2), le bilan énergétique net de l'opération est de deux ATP formés par glucose consommé. La quantité d'énergie chimique conservée dans le pyruvate reste considérable, car ces deux ATP représentent seulement 2 % de l'énergie disponible dans les liaisons du glucose.

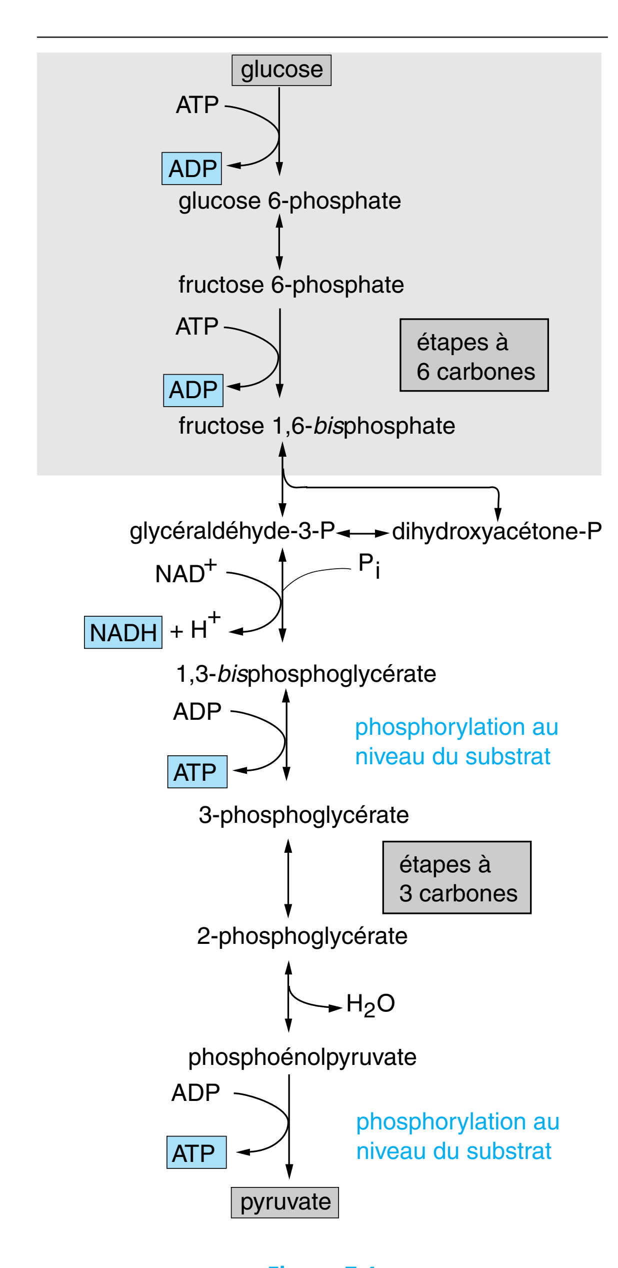


Figure 7.1

Schéma simplifié de la glycolyse

On distingue deux grandes périodes au sein de cette voie de dégradation du glucose. La première correspond à des étapes de phosphorylation des sucres, tandis que la seconde conduit à la production d'ATP.
La découverte de la glycolyse revient aux frères BÜCHNER (1892) qui ont montré que la fermentation alcoolique se produisait en l'absence de cellules (dans des extraits acellulaires), contrairement à ce que pensait PASTEUR.

• En l'absence d'O_2, le pyruvate formé par la glycolyse est repris dans diverses réactions que l'on rassemble sous le nom de fermentations. Les plus connues d'entre elles sont la **fermentation alcoolique**, dont le principal agent est la levure de bière, et la **fermentation lactique**, qui se produit dans le muscle et chez de nombreuses Bactéries (voir *figure* 7.2). Malgré leur diversité, il faut comprendre que ces mécanismes ont une seule signification biochimique : la régénération des coenzymes réduits (ici, le NADH), par déversement de leurs électrons sur un accepteur organique. C'est la seule condition pour que la glycolyse puisse fonctionner de manière continue et fournir de l'énergie, puisqu'il n'y a pas de stocks importants de ce coenzyme sous la forme oxydée. En présence d'O_2, les coenzymes réduits produits dans le hyaloplasme sont réoxydés au sein des mitochondries, en même temps que ceux issus de la dégradation du pyruvate. De nombreuses autres fermentations, produisant des composés tels que des alcools : propanol, butanol, ou des acides : acétique, propionique, butyrique, sont décrites chez divers micro-organismes ; certaines dérivent aussi du cycle des HMP, étudié plus loin.

1.1.2. La voie des hexoses monophosphate (HMP) et la fourniture de pouvoir réducteur

Ce système de réactions, parfois appelé **voie des pentoses phosphate**, est lui aussi universel ; il s'agit d'un cycle oxydatif complexe, entièrement hyaloplasmique, partant du glucose 6-phosphate pour aboutir à deux intermédiaires de la glycolyse : le fructose 6-phosphate et le 3-phosphoglycéraldéhyde. La première étape est une **décarboxylation oxydative** qui conduit à former un composé à 5 carbones : le ribulose 5 phosphate. Ce pentose est très important dans le métabolisme, car il est un précurseur du ribose 5-phosphate et donc des **nucléotides**, que l'on trouve aussi bien dans les macromolécules telles que l'ARN ou l'ADN, que dans la constitution de nombreux coenzymes : $NAD(P)^+$, FAD, FMN, coenzyme A, etc.

Le détail des réactions chimiques ne sera pas décrit ici, mais le bilan de cette voie doit être donné : si l'on part de 6 molécules de glucose (C6) qui sont décarboxylées, cela équivaut à en dégrader complètement une (6 CO_2). Dans le même temps, 12 molécules de NADPH, dont le rôle sera précisé plus loin, sont obtenues à partir de 12 $NADP^+$. Les composés en C5 qui ne sont pas dirigés vers l'anabolisme servent à reconstituer, à

Figure 7.2

Réactions chimiques impliquées dans les fermentations alcoolique et lactique

Noter que le NADH produit dans la glycolyse sert dans les deux cas à réduire le produit final de la chaîne : le pyruvate. Il y a une production de CO_2 dans la fermentation alcoolique.

ⓐ $CH_3CO\ COOH + NADH + H^+ \longrightarrow NAD^+ + CH_3CH_2OH + CO_2$ — 235 kJ/mole

(acide pyruvique → alcool éthylique)

ⓑ $CH_3CO\ COOH + NADH + H^+ \rightleftharpoons NAD^+ + CH_3CHOH\ COOH$ — 196 kJ/mole

(acide pyruvique → acide lactique)

travers une série complexe de clivages, d'interconversions, d'isomérisations et de condensations successives, des trioses ou des hexoses appartenant à la glycolyse (voir *figure* 7.3). Ces réactions, qui mettent en jeu des composés phosphorylés inhabituels en C4 et en C7, forment un ensemble très voisin de celui qui existe dans le stroma des chloroplastes, et qui participe à la fixation du CO_2 dans les molécules organiques (cycle de Calvin-Benson).

À la différence du NADH produit par la glycolyse, qui est essentiellement oxydé au cours de la respiration, le rôle du NADPH produit dans le cycle des HMP est de fournir des atomes de H et des électrons pour la synthèse de molécules réduites, telle que celle des lipides, qui en « consomme » beaucoup. La signification biologique de cette voie est illustrée, chez les Mammifères par exemple, par le fait qu'elle est très active dans le tissu adipeux ou la glande mammaire en lactation, et au contraire très faible dans le muscle.

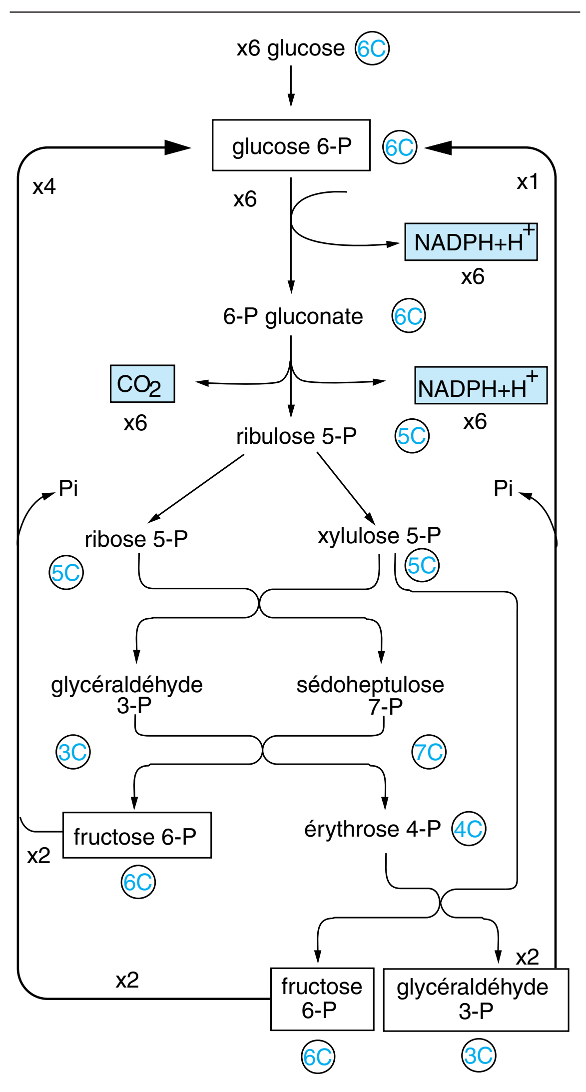


Figure 7.3

Schéma simplifié de la voie des hexoses monophosphate

Après deux réactions d'oxydoréduction, diverses interconversions se déroulent au cours de cette voie, mettant en jeu des composés en C3, C4, C5, C6 et C7. Ce métabolisme est branché sur celui des nucléotides via le ribose 5-phosphate. Cette voie a été découverte après la glycolyse et le cycle de Krebs, et analysée à partir des années 40.

1.2. Synthèse et dégradation des acides aminés au sein du cytoplasme. Notion d'intégration du métabolisme

La voie glycolytique a une double fonction puisqu'elle sert, d'une part, à dégrader le glucose pour en tirer de l'énergie et, d'autre part, à alimenter le métabolisme intermédiaire en précurseurs carbonés, en particulier pour la synthèse de nombreux acides aminés. À l'inverse, elle participe aussi de façon importante à la dégradation de ces derniers, à travers un processus nommé gluconéogenèse, qui permet aussi de recycler d'autres composés afin d'en tirer toute l'énergie chimique. Cet exemple simple suffit à montrer comment le métabolisme énergétique et le métabolisme intermédiaire sont étroitement interconnectés au sein du catabolisme.

1.2.1. Glycolyse et synthèse des acides aminés

Les 20 acides aminés des protéines sont synthétisés grâce à autant de chaînes de biosynthèse différentes, dont beaucoup sont extrêmement complexes et ne peuvent être décrites ici. Certaines d'entre elles utilisent comme précurseurs carbonés des intermédiaires de la glycolyse, ainsi que l'acide pyruvique. L'acide 3-phosphoglycérique, par exemple, est à la base de la fabrication de la sérine et du glycocolle. De même, le phosphoénolpyruvate est à l'origine des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane). Enfin, l'acide pyruvique permet la synthèse de l'alanine, de la valine, de la leucine et de l'isoleucine. La localisation cellulaire de ces voies est partiellement ou totalement hyaloplasmique.

Le cycle de Krebs, qui sera étudié dans le chapitre 10, est à la fois la plaque tournante du catabolisme et le fournisseur des métabolites servant à fabriquer tous les autres acides aminés, en particulier grâce à deux de ses intermédiaires : les acides α cétoglutarique et oxaloacétique. Le premier est particulièrement important, car il est le seul composé qui permette, chez les Animaux, une fixation directe de $NH4^+$ sur un chaînon carboné, en donnant l'acide glutamique. Ce dernier sert de donneur de groupe aminé et est à l'origine directe ou indirecte (par transamination : transfert de son NH_3 sur un acide α cétonique) de tous les acides aminés, y compris ceux utilisant les précurseurs de la glycolyse signalés plus haut.

1.2.2. Gluconéogenèse

Un bon exemple de collaboration métabolique entre compartiments cellulaires, et d'intégration des activités chimiques dans la cellule est celui de la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques, ou **gluconéogenèse** ; celle-ci implique en effet le fonctionnement conjoint de la glycolyse et du cycle de Krebs. Chez les Vertébrés, cette voie se déroule surtout dans le foie et à un moindre degré dans les reins. Chez l'Homme, les réserves glucidiques (glucose circulant et glycogène hépatique) sont suffisantes pour permettre un seul jour de jeûne glucidique. Sachant que le cerveau est le tissu qui consomme le plus de glucose, il faut absolument, au-delà de cette durée, que ce nutriment soit fabriqué à partir de sources non glucidiques.

Bien que la gluconéogenèse soit définie comme la voie convertissant le pyruvate en glucose, d'autres points d'entrée sont possibles le long de celle-ci. Chez les Animaux, les principales molécules qui l'alimentent sont : le glycérol, l'acide lactique et surtout les acides aminés. L'origine de ces métabolites est la suivante : 1) Ie glycérol, qui est issu de l'hydrolyse des triglycérides, est oxydé en dihydroxyacétone-P (intermédiaire de la glycolyse) ; 2) le lactate d'origine fermentaire (dans les muscles, par exemple), est converti en pyruvate par oxydation, au cours d'une réaction inverse de celle de la fermentation ; s'il n'était pas ainsi métabolisé, ce composé serait un cul-de-sac de l'activité cellulaire ; 3) la plupart des acides aminés peuvent être également transformés en pyruvate ou oxaloacétate, à la suite de transaminations. Chez certains Végétaux, il existe une possibilité d'utiliser les lipides pour fabriquer des sucres, grâce à la gluconéogenèse (voir chapitre 10).

Chez les hétérotrophes, les acides aminés apportés en excès par l'alimentation (par rapport aux besoins liés à la synthèse des protéines) ne peuvent faire l'objet d'un stockage, comme c'est le cas pour les glucides ou les lipides (voir plus loin). N'étant pas non plus excrétés, ils sont en fait d'abord désaminés (par transamination) et convertis en chaînons carbonés qui rejoignent les voies du catabolisme (voir chapitre 10). Par ailleurs, toutes les cellules renouvellent en permanence leurs protéines et fournissent ainsi des acides aminés libres, dont une partie est dirigée vers la gluconéogenèse, en cas de jeûne glucidique. Les points d'entrée des chaînons dérivés des acides aminés sont multiples, et situés aussi bien dans la glycolyse que dans le cycle de Krebs (voir la *figure* 7.4).

Au plan biochimique, et en simplifiant, deux points importants sont à retenir :

– la gluconéogenèse n'est pas «l'inverse» de la glycolyse ; il existe en effet le long de celle-ci des réactions pratiquement irréversibles qu'il faut contourner (réactions n° 1, 3 et 9 du schéma de la *figure* 7.1). Pour être thermodynamiquement possible, la conversion du pyruvate en glucose exige, au total, la consommation de deux molécules riches en énergie : 1 GTP et 1 ATP ;
– le passage du pyruvate au phosphoénolpyruvate implique l'intervention des mitochondries à deux niveaux : la réaction : pyruvate → oxaloacétate, et le fonctionnement à rebours du cycle de Krebs au niveau de l'étape : NADH + oxaloacétate ↔ malate. Des transporteurs spécifiques de la membrane mitochondriale interne inter-

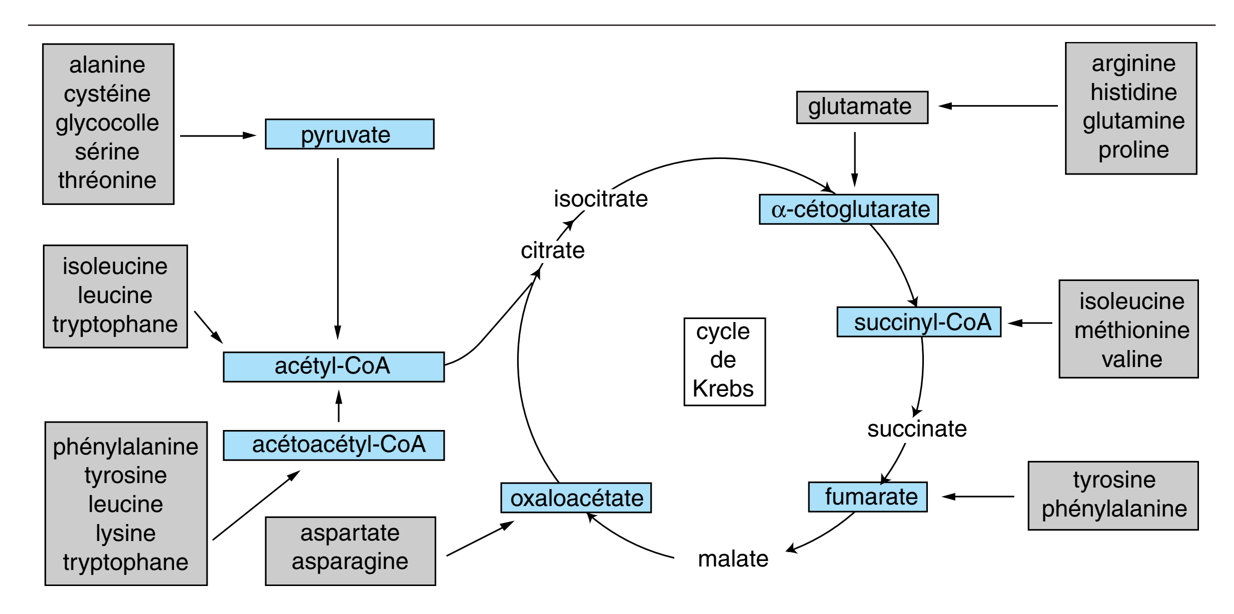


Figure 7.4

Production par les acides aminés de chaînons carbonés rejoignant la glycolyse et le cycle de Krebs

Noter les trois points d'entrée permettant leur dégradation : pyruvate, acétyl-CoA et acides du cycle tricarboxylique.

viennent dans ce système au niveau des échanges de pyruvate et de malate entre hyaloplasme et mitochondrie ; cette membrane est en effet imperméable à l'oxaloacétate, intermédiaire obligé qui n'a pas de transporteur propre, et ceci est résolu par le système complexe décrit dans la *figure* 7.5.

2. ACCUMULATION ET DÉGRADATION DES RÉSERVES CHEZ LES PROCARYOTES ET LES EUCARYOTES

L'anabolisme, qui conduit à la synthèse de nouvelle matière vivante, permet non seulement le renouvellement de celle-ci et la croissance cellulaire, mais aussi la production de réserves alimentaires et énergétiques ; celles-ci seront utilisées ultérieurement par les cellules, en cas de pénurie. Après dégradation, elles fournissent aux cellules des métabolites que l'on retrouve le plus souvent dans les voies du catabolisme énergétique. Les réserves se présentent en général sous forme de macromolécules insolubles dans l'eau ; celles-ci constituent en effet un mode de stockage efficace de monomères, car elles n'augmentent pas la pression osmotique interne des cellules, comme le ferait une quantité équivalente de monomères en solution (composés osmotiquement inertes).

2.1. Structures de réserve chez les Procaryotes et les Eucaryotes

Les macromolécules servant de réserve présentent une composition chimique très variée ; elles peuvent former des structures rencontrées directement dans le hyaloplasme, ou bien être accumulées au sein d'organites spécialisés, dérivant le plus souvent d'organites classiques, mais dont le fonctionnement est dévié dans le sens d'un stockage à court ou long terme. La nature des réserves dépend donc non seulement du type cellulaire, mais aussi de son état physiologique, de son âge et de nombreux paramètres environnementaux.

2.1.1. Réserves accumulées au sein du hyaloplasme

Les cellules accumulent, directement au sein de leur hyaloplasme, des matériaux organiques (et inorganiques) constituant généralement des réserves d'énergie, mais aussi des réserves de chaînons carbonés pour alimenter l'anabolisme. Lorsque ces

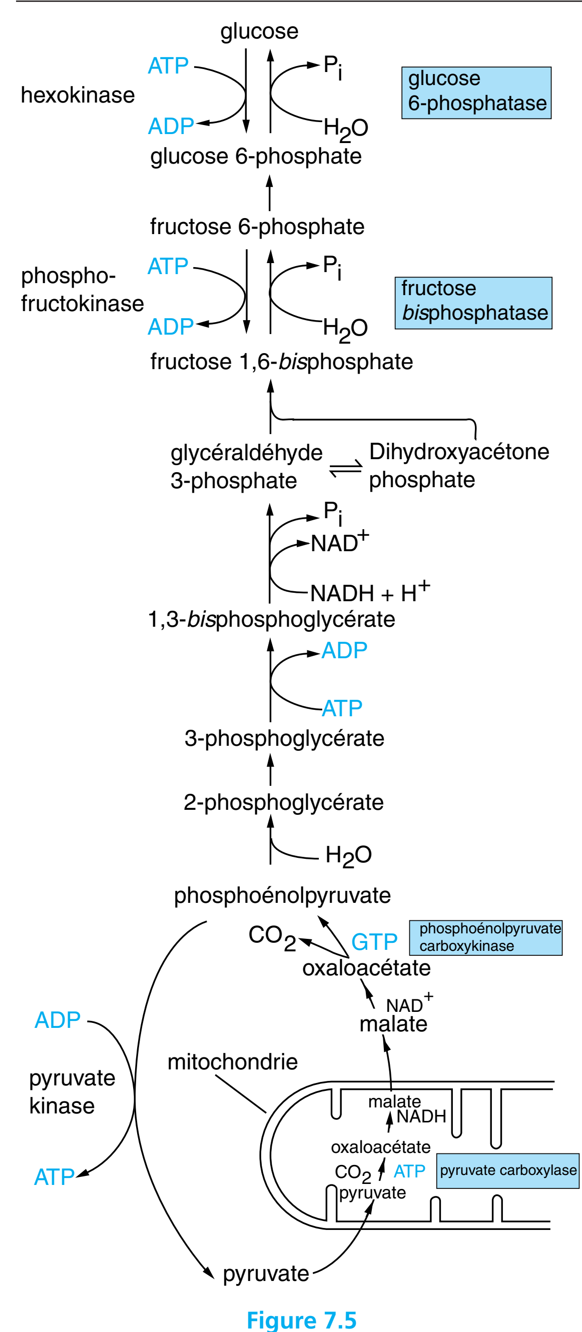


Figure 7.5

Principe de la gluconéogenèse

Ce schéma met en évidence ses rapports avec la glycolyse et localise ses principales étapes au sein de la cellule. Noter l'intervention obligatoire des mitochondries dans la transformation du pyruvate en phosphoénolpyruvate.

substances forment des structures atteignant une taille suffisante, elles deviennent visibles au microscope ; on les nomme parfois **enclaves inertes**, leur ensemble formant le **paraplasme**. Elles se présentent sous forme de granulations ou de gouttelettes non limitées par des membranes, dont on peut identifier la nature précise grâce à des tests cytochimiques, tels que le test à l'APS, qui sera décrit plus loin. Chez les Végétaux, on inclut parfois la paroi dans le paraplasme.

• Chez les Bactéries, lorsque les sources alimentaires sont abondantes et équilibrées, il n'y a pas d'accumulation de réserves ; seules une croissance active et une mutiplication cellulaire sont alors observées. En revanche, dans un milieu riche en substrat carboné mais déficient en azote, elles tendent à accumuler des polymères qui représentent jusqu'à 50 % du poids sec des cellules. Selon leur composition et leur rôle physiologique, on distingue trois types de composés : 1) des polymères organiques, qui servent de réserve de carbone et d'énergie, 2) des polymères inorganiques, et 3) du soufre élémentaire, plus rarement du fer.

Les macromolécules organiques sont le plus souvent représentées par le **glycogène**, parfois l'**amidon** ou l'**acide poly-β-hydroxybutyrique**, visibles sous forme de granules dans le cytoplasme. Les deux premiers, dont la composition sera rappelée plus loin, sont des formes de stockage du glucose (**polysaccharides**) ; le dernier est un composé non lipidique mais fixant cependant les colorants spécifiques des graisses. Chez les Bactéries, la nature des réserves est en général caractéristique d'une espèce ou d'un groupe, et elle constitue souvent un bon critère taxinomique. Par exemple, le glycogène est rencontré chez les Entérobactéries ou les Cyanobactéries, les Bactéries pourpres accumulent à la fois le glycogène et l'acide poly-β-hydroxybutyrique, etc.

La **volutine** est un polymère inorganique (polyphosphate), qui est utilisé comme réserve d'orthophosphate, pour la fabrication des acides nucléiques, par exemple. Ce composé spécifique des Bactéries se présente sous forme de granulations colorables en rouge par le bleu de toluidine. Chez les Sulfobactéries photosynthétiques pourpres, qui utilisent l'H_2S comme donneur d'électrons, on observe des **granules de soufre** très réfringents, au sein du cytoplasme, résultant de l'oxydation de ce dernier. Ils y sont accumulés lorsque l'H_2S est abondant, et constituent une réserve d'énergie car le soufre peut également être oxydé en sulfates (voir *figure* 7.6). Des observations équivalentes sont faites chez les Bactéries qui stockent et oxydent le fer. Enfin, une réserve d'azote, sous la forme d'acides aminés polymérisés en longs polypeptides, organisés en grosses

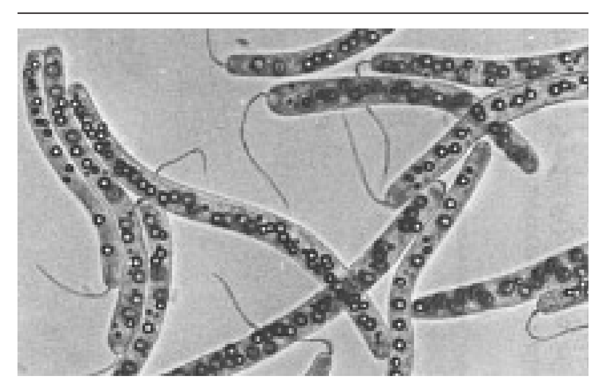


Figure 7.6

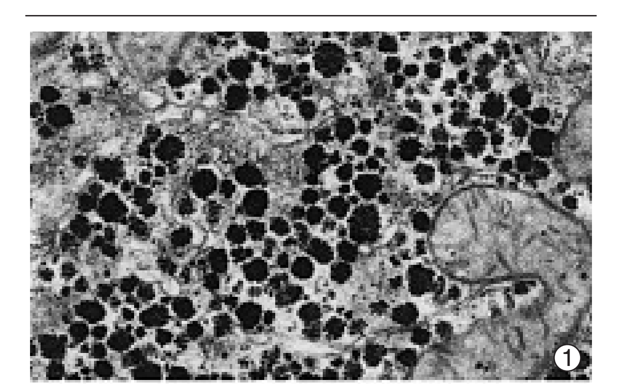
Bactéries pourpres photosynthétiques

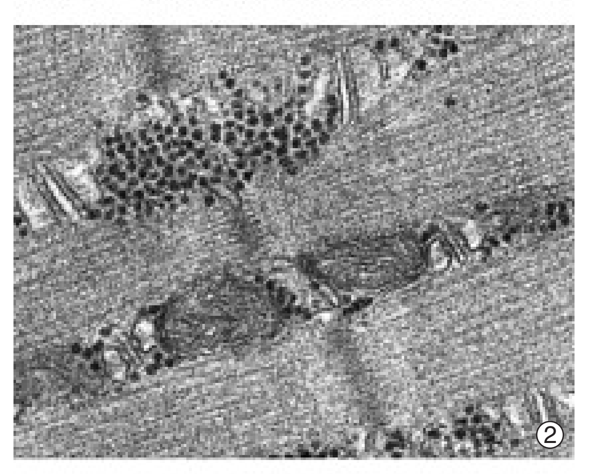
Remarquer la présence de granules de soufre dans le cytoplasme (genre *Thiospirillum*). (Cliché Labo BG, Orsay).

inclusions cytoplasmiques : la **cyanophycine**, est présente chez les Cyanobactéries.

• Chez les Eucaryotes, les composés de réserve accumulés dans le hyaloplasme sont essentiellement constitués par le glycogène et les lipides.

Le **glycogène** est un homopolyoside insoluble dans l'eau, non réducteur et fortement ramifié (masse moléculaire > 10^8 Da) ; il est formé de molécules de glucose associées par des liens α 1 $\rightarrow$ 4, formant des chaînes de 11 à 18 unités qui portent des branchements latéraux formés de la même façon, unis par des liaisons α 1 $\rightarrow$ 6. En raison de sa ressemblance structurale avec l'amylopectine, qui est un élément de l'amidon, on l'appelle parfois «amidon animal», bien qu'on le trouve chez de nombreux autres êtres vivants. Ce composé est colorable en rouge brun par l'eau iodo-iodurée ; en microscopie ultrastructurale, il se présente sous la forme de petites rosettes très opaques aux électrons (voir *figure* 7.7). Chez les Vertébrés, il est fortement accumulé dans les **hépatocytes** (fonction glycogénique du foie, découverte par Claude BERNARD, en 1855) et, à un moindre degré, dans les cellules musculaires ou rénales. Il existe aussi en abondance chez les Invertébrés, les Champignons et certaines Rhodophycées (Algues rouges) d'eau douce. D'autres polysaccharides spécifiques peuvent être rencontrés, tels que l'**amidon** dit **floridéen**, chez les Algues rouges ; celui-ci a une structure chimique différente de l'amidon ordinaire et n'est pas synthétisé dans des chloroplastes, mais est présent directement dans le hyaloplasme. De même, le **paramylon** est un composé glucidique formant de grosses inclusions dans les cellules des Euglénophytes.





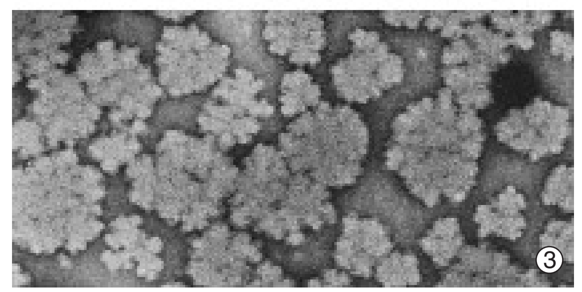


Figure 7.7

Granules de glycogène dans les tissus animaux

Exemples de cellules observées en microscopie électronique : **(1)** cellule hépatique ; **(2)** cellule musculaire striée ; **(3)** aspect des rosettes de glycogène après purification et coloration négative.
Taille des particules : 30-200 nm de diamètre. (Clichés J. André, Labo BC4, Orsay).

L'identification chimique des polysaccharides au sein des structures cellulaires est réalisée au moyen d'un test cytochimique spécifique (dit APS), décrit dans l'encart suivant.

Les lipides de réserve sont des **triglycérides**, c'est-à-dire des esters d'acides gras et de glycérol. La nature des acides gras, dont la longueur des chaînes hydrocarbonées et le degré de saturation

Encart technique

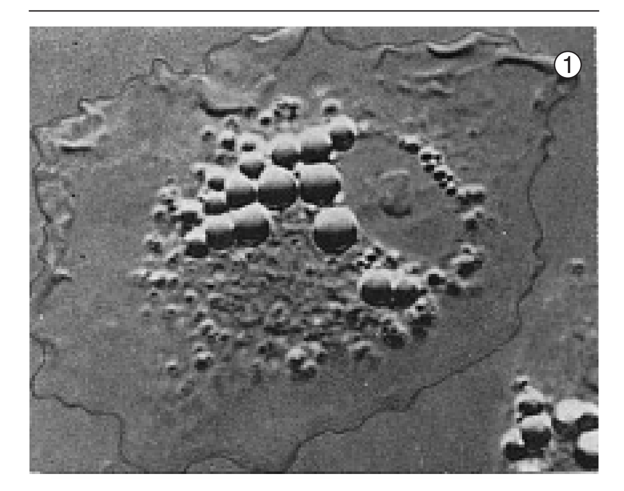
Détection des polysaccharides par la réaction à l'acide periodique-Schiff (APS)

Cette réaction permet de colorer spécifiquement les polysaccharides sur des coupes histologiques. Celles-ci sont traitées pendant quelques minutes à l'acide periodique dilué (IO_4H) ; cet oxydant léger entraîne la rupture de la liaison covalente existant entre les carbones 2 et 3 des hexoses sous la forme pyranose, ce qui fait apparaître une fonction aldéhydique réductrice sur chacun d'eux. Ces fonctions sont alors repérées grâce à un réactif chimique spécifique : le réactif de Schiff (fuschine basique décolorée par SO_2), qui se recolore à leur niveau en violet-mauve. La liaison entre ce dernier et la fonction aldéhydique étant covalente, la stœchiométrie qui en découle rend cette coloration quantitative et permet une mesure de la quantité de molécule cible, grâce à la cytophotométrie, directement sur la coupe histologique.

Diverses expériences témoins sont nécessaires pour que la démonstration soit complète : réaction avec oxydation, mais sans Schiff, pour évaluer l'éventuelle présence de colorations endogènes ; sans oxydation, mais avec Schiff, pour évaluer la présence de fonctions aldéhydiques libres préexistantes. Les polysaccharides détectés par ce test constituent le plus souvent des structures stables et de taille suffisamment importante pour pouvoir être visualisées, dans les cellules, au microscope optique : parois cellulosiques, grains d'amidon, granules de glycogène et glycocalyx. Ce protocole a été adapté pour la microscopie électronique : un protéinate d'argent opaque aux électrons se combine à un réactif approprié des aldéhydes fixé sur les molécules cibles après oxydation.

varient, confère aux lipides leurs propriétés spécifiques, en particulier la température de fusion : plus les chaînes sont courtes et insaturées et plus le point de fusion est bas ; c'est le cas des huiles (riches en acide oléique et linoléique) par rapport aux graisses (riches en acide palmitique ou stéarique). Grâce à leurs longues chaînes hydrocarbonées, les triglycérides constituent une importante source d'énergie dans le métabolisme oxydatif. Leur insolubilité dans l'eau fait qu'ils occupent un minimum d'espace dans les cellules, contrairement aux sucres qui existent sous une forme très hydratée et donc moins condensée. À volume égal, les graisses ou les huiles représentent 6 à 7 fois plus d'énergie que les sucres, et elles constituent des réserves énergétiques par excellence chez les Animaux ou les Végétaux.

• Chez les Végétaux, les lipides sont représentés par les beurres et les huiles ; ils sont rencontrés dans les cellules de presque toutes les graines, sous forme d'inclusions réfringentes (très abondantes dans les graines et les fruits oléagineux : arachide, colza, tournesol, olive, noix, lin, etc.). Par leur utilisation alimentaire, industrielle ou thérapeutique, ils jouent un rôle important dans l'économie. Chez tous les Animaux, on trouve aussi des huiles et des graisses neutres en abondance, sous forme de gouttelettes plus ou moins grosses, localisées dans le cytoplasme des cellules des tissus adipeux : les **adipocytes** (voir *figure* 7.8) ; par-



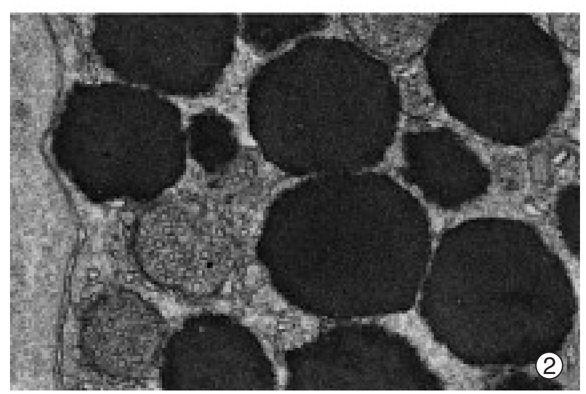


Figure 7.8

Réserves lipidiques dans un adipocyte en culture

(1) Les gouttelettes réfringentes au sein du cytoplasme représentent des globules de triglycérides. **(2)** Aspect des réserves lipidiques en microscopie électronique.
Noter que les globules ne sont pas limités par une membrane. (Clichés Labo BG et J. André, Labo BC4, Orsay).

fois une seule grosse goutte remplit pratiquement toute la cellule. L'exemple des hépatocytes des Vertébrés peut aussi être rappelé, car ceux-ci contiennent dans leur hyaloplasme, outre une grande quantité de glycogène, de nombreuses gouttelettes de lipides.

Il faut enfin signaler le cas particulier du stockage du fer, sous une forme liée à une protéine nommée **ferritine**, que l'on rencontre dans le cytoplasme des cellules du foie ou de la rate, chez les Vertébrés, ou bien chez les Végétaux et les Champignons (phytoferritine)

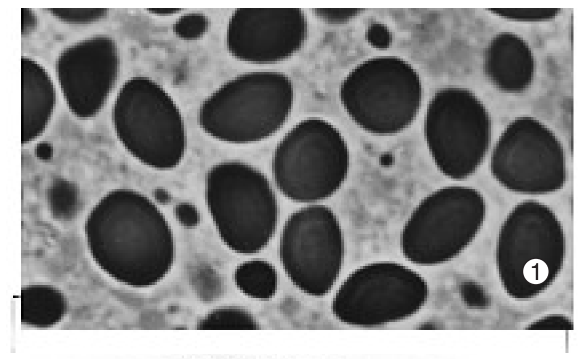
2.1.2. Structures de réserve spécialisées des cellules eucaryotiques

Il s'agit de structures cellulaires, limitées par une ou deux membranes, qui dérivent d'organites classiques après une spécialisation dans la fonction d'accumulation de réserves ; on les observe aussi bien dans les cellules animales que dans les cellules végétales.

• Les **plaquettes vitellines** des ovocytes de nombreux Animaux constituent des structures de stockage de protéines ou de lipoprotéines, le plus souvent d'origine exogène. Ce sont des organites de grande taille et de densité élevée, limités par une membrane unique ; on les trouve par exemple dans le cytoplasme des œufs des Vertébrés qui sont riches en réserves (Poissons, Amphibiens, Reptiles et Oiseaux), où ils peuvent représenter jusqu'à 85 % des protéines cellulaires. Les protéines s'y trouvent très concentrées et déshydratées, dans un état pseudocristallin, de telle sorte qu'on peut observer un réseau géométrique en microscopie électronique ; la périphérie d'une plaquette vitelline est constituée d'une zone de matériel amorphe (voir *figure* 7.9). L'origine des protéines formant ces structures et les mécanismes qui président à leur élaboration seront décrits plus loin.

• Les **amyloplastes** sont des plastes spécialisés rencontrés chez les Végétaux verts ; il s'agit de plastes incolores (sans pigments photosynthétiques) qui fabriquent et stockent l'**amidon** pour de longues durées. Les **grains d'amidon**, dont la taille peut atteindre 150 µm, ne sont rien d'autre que des plastes bourrés de ce composé de réserve glucidique. Selon leur mode de formation, qui est caractéristique d'espèce, les grains d'amidon ont une forme, une taille et une organisation interne bien particulières (voir *figure* 7.10). Outre les graines amylacées, où ils sont très abondants (céréales), on les trouve dans les tissus parenchymateux de réserve, présents dans les tiges, les tubercules (pomme de terre), les racines et certains fruits tels que la banane. Ces organes permettent aux Végétaux de franchir la mauvaise saison, tout en assurant parfois une multiplication végétative. On rappelle que les chloroplastes banals sont capables de stocker l'amidon pendant la journée, et qu'ils l'hydrolysent la nuit (voir chapitre 10).

L'amidon est un homopolyoside non réducteur, formé uniquement de glucose ; il est constitué de deux types de molécules en proportions variables selon les espèces : l'**amylose** (25 % chez la pomme de terre, 5 % chez le maïs) et l'**amylopectine**. La première est formée de longues chaînes linéaires d'unités-glucose (1 à 4.10^3 résidus) liées par des liens α 1 → 4 ; la seconde est une molécule très ramifiée, de masse moléculaire élevée (jusqu'à



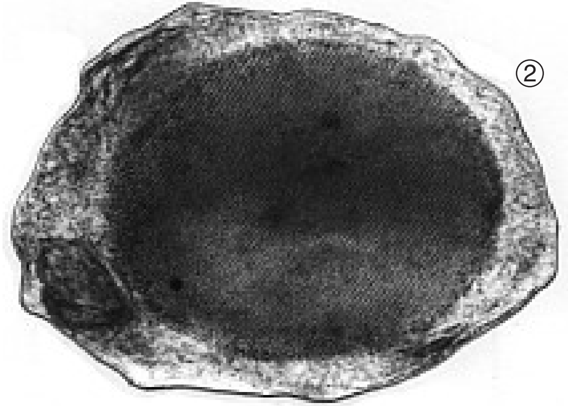
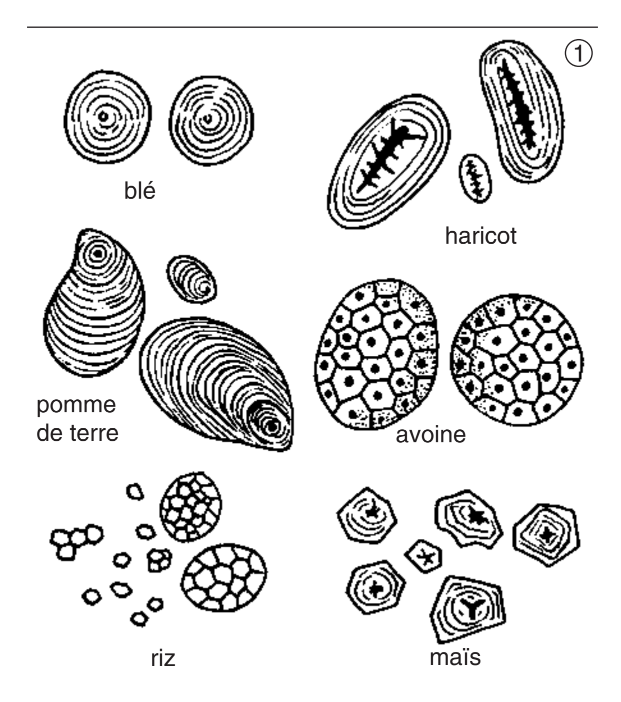


Figure 7.9

Plaquettes vitellines chez un Amphibien

(1) Cliché obtenu en microscopie photonique (coupe d'ovocyte de xénope ; × 3 500). **(2)** Cliché obtenu en microscopie électronique (plaquette isolée).
Noter la présence d'une partie centrale cristallisée, d'une zone périphérique amorphe et d'une membrane limitante ; × 20 000. (Clichés Labo BG, Orsay).



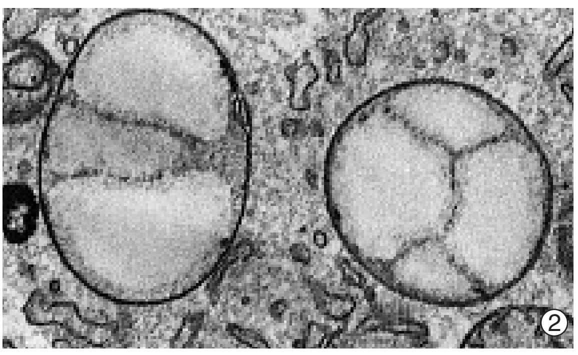


Figure 7.10

Diversité des grains d'amidon et des amyloplastes

(1) Aspects observés en microscopie photonique. **(2)** Aspect en microscopie électronique de deux amyloplastes dans un grain de pollen de *Streptocarpus*. Grossissement × 50 000. (Clichés J. Orcival, Orsay).

10^8 Da), formée de chaînes du même type, mais comportant de nombreux branchements latéraux (liaisons α 1 $\rightarrow$ 6, tous les 20-30 résidus).

• Les **oléoplastes** (ou élaïoplastes) et les **protéoplastes** sont des plastes spécialisés respectivement dans l'accumulation de lipides et de protéines. En marge de ces organites, on peut mentionner les **leucoplastes**, non pigmentés, qui sont observés dans des cellules sécrétrices d'essences ou de résines (chez le pin, par exemple) ; ces derniers ne semblent pas avoir de fonction de réserve.

• Les **parois** épaissies des cellules végétales servent parfois de lieu de stockage de glucides, sous forme de polysaccharides particuliers. Dans le cas, par exemple, de l'albumen de nombreuses graines : dattier, et de plusieurs familles : Liliacées, Rubiacées, etc., on trouve des polymères du mannose (mannanes). Dans les parois des cellules cotylédonaires des embryons de Légumineuses, existent des polymères à base de glucose, galactose et xylose (xyloglucanes). Tous ces composés sont hydrolysés lors de l'hydratation de la graine, et les produits d'hydrolyse sont utilisés par l'embryon en croissance.

• Les **vacuoles** des cellules végétales, des Champignons et des Algues, mettent en réserve des petites molécules (sucres, acides organiques et acides aminés) ou des macromolécules (protéines, sous la forme des grains d'aleurone dans certaines cellules, inuline ; voir paragraphe 4.2).

2.2. Métabolismes et mécanismes conduisant à l'accumulation des réserves

Afin de comprendre l'origine de certaines des structures de réserve précédemment signalées, il est utile de compléter cette description par quelques informations biochimiques. Seuls de simples rappels peuvent être donnés dans le cadre de cet ouvrage ; ils permettent cependant d'illustrer une notion importante en biochimie, à savoir la nécessité d'un couplage entre des réactions thermodynamiquement favorisées (exergoniques), comme l'hydrolyse des molécules «riches en énergie» : ATP, UTP etc., et des réactions qui consomment de l'énergie (endergoniques), telles que celles intervenant dans l'anabolisme. La polymérisation des macromolécules implique toujours en fait des précurseurs préalablement activés par des nucléotides (ou des nucléotides eux-mêmes, évidemment, s'il s'agit de la synthèse des acides nucléiques).

2.2.1. Stockage de molécules à rôle énergétique direct

Il n'y a pas de stockage d'ATP dans les cellules ou les organismes. Cette impossibilité est liée au fait qu'une quantité considérable de celui-ci doit être hydrolysée, pour assurer toutes les activités cellulaires. Chez l'Homme, par exemple, on calcule que la consommation quotidienne de ce nucléotide est d'au moins 40 kg, d'où la nécessité d'un renouvellement constant. Il existe cependant quelques

exemples de molécules pouvant être considérées comme des réserves directes d'énergie : 1) la **phosphocréatine** des cellules musculaires des Vertébrés, qui sert à recharger instantanément l'ADP, dès que l'ATP est consommé, et avant qu'il ait pu être reconstitué par les métabolismes aérobie ou anaérobie du muscle ; 2) la **phosphoarginine** joue le même rôle chez les Invertébrés. Il est à noter que ces deux composés ne forment pas de structure visible au sein des cellules.

2.2.2. Synthèse du glycogène et des lipides

• La synthèse du glycogène a lieu dans le hyaloplasme de nombreuses catégories de cellules animales ; elle implique des enzymes qui restent associées à la surface des granules formés par ce polymère (de même que les enzymes qui interviennent dans sa dégradation, comme nous le verrons plus loin). La réaction mise en œuvre nécessite en général une courte amorce de glycogène (glycogène $_n$), qui est allongée grâce à sa liaison avec une forme activée du glucose : l'UDP-glucose. Ce dernier résulte lui-même de l'action du nucléotide UTP (uridine tri-phosphate) sur le glucose 1-phosphate (G 1-P), avec production de pyrophosphate (P-Pi). La polymérisation des chaînes linéaires (liaisons α 1 $\rightarrow$ 4) résulte donc de la séquence des deux réactions suivantes :

$$\text{G 1-P} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-glucose} + \text{P-Pi}$$
$$\text{UDP-glucose} + \text{glycogène}_n \rightarrow \text{UDP} + \text{glycogène}_{n+1}$$

Ce mécanisme récurrent d'allongement, catalysé par la **glycogène synthétase**, doit être complété par l'intervention d'une **enzyme de branchement**, qui permet la réalisation des ramifications (liaisons α 1 $\rightarrow$ 6) ; son mode d'action n'est pas décrit ici.

• La synthèse des lipides a également lieu dans le hyaloplasme. La fabrication des acides gras implique un très gros complexe enzymatique : l'acide gras synthétase, qui a un diamètre de plus de 20 nm et une masse moléculaire de $2{,}3.10^6$ Da chez la levure. La chaîne hydrocarbonée est allongée par addition séquentielle de chaînons acétyle (CH_3-CO) fournis sous forme d'acétyl-Co A, et provenant indirectement du métabolisme du pyruvate au sein des mitochondries (voir chapitre 10). Deux autres substrats sont nécessaires : le NADPH qui est le donneur d'électrons (2 NADPH par cycle), et l'ATP qui est le donneur d'énergie pour assurer les liaisons. Des chaînes comprenant jusqu'à 16 atomes de C sont ainsi synthétisées ; le fonctionnement de ce système enzymatique est d'une grande complexité.

2.2.3. Synthèse du saccharose et de l'amidon

Ce métabolisme se déroule au sein des cellules qui réalisent la **photosynthèse** (voir chapitre 10). Celle-ci produit des **trioses-phosphates** qui sont, soit exportés hors du chloroplaste, en empruntant un transporteur spécifique de la membrane interne (un échange de type antiport avec un ion phosphate), soit utilisés dans le stroma pour fabriquer une macromolécule de stockage à court terme : l'**amidon**, qui ne change pas l'osmolarité du contenu de l'organite. Les trioses, les hexoses et surtout les disaccharides, servent de moyen de transport des sucres vers les organes non photosynthétiques et hétérotrophes (tissus profonds ou racines) où ils sont oxydés par les mitochondries, pour fournir l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire. Dans le cas des organes de réserve, cependant, ils peuvent être convertis en amidon, au sein des amyloplastes signalés plus haut.

• Le **saccharose** est un diholoside non réducteur, très soluble dans l'eau, formé par la liaison d'un glucose et d'un fructose. Il constitue en général la forme circulante des sucres chez les Végétaux, et est considéré comme l'équivalent du glucose chez les animaux ; la sève élaborée qui le transporte emprunte la voie des tubes criblés du phloème. Dans certaines plantes, ce composé peut faire aussi l'objet d'un stockage au sein des vacuoles de tissus spécialisés ; c'est le cas des parenchymes de la betterave sucrière ou de la canne à sucre (voir plus loin). Le saccharose est synthétisé dans le hyaloplasme à partir de glucose 1-phosphate et de fructose 6-phosphate (F 6-P) formés par la photosynthèse. Cette synthèse implique en outre l'intervention d'un nucléotide (ici, l'UTP), comme c'est le cas pour la synthèse de tous les polysaccharides. On a la série de réactions suivante :

$$\text{G 1-P} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-glucose} + \text{P-Pi}$$
$$\text{UDP-glucose} + \text{F 6-P} \rightarrow \text{UDP} + \text{saccharose 6-P}$$
$$\text{saccharose 6-P} + H_2O \rightarrow \text{saccharose} + \text{Pi}$$

De même que pour la synthèse du glycogène, l'énergie de liaison contenue dans le glucose activé (UDP-glucose) sert à réaliser la liaison covalente avec le fructose.

• L'**amidon** est stocké dans les chloroplastes lors des conditions de photosynthèse excessive,

mais la nuit il est dégradé pour remplir les besoins métaboliques du végétal. Comme on l'a déjà mentionné, ce composé peut aussi être accumulé dans des organes qui ne font jamais la photosynthèse eux-mêmes, à partir du saccharose circulant (tubercules, rhizomes, fruits, graines). La synthèse de l'amidon commence par la conversion de G 6-P en G 1-P, et elle nécessite un nucléotide qui est dans ce cas l'ATP ; le principe est le même que pour la synthèse du glycogène :

$$\text{G 1-P} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP-glucose} + \text{P-Pi}$$

$$\text{ADP-glucose} + \text{amidon}_n \rightarrow \text{ADP} + \text{amidon}_{n+1}$$

Cette réaction, catalysée par l'**amylose synthétase**, allonge les chaînes linéaires d'amylose (α 1 $\rightarrow$ 4) ; la synthèse de l'amylopectine, polymère plus complexe ayant des branchements en α 1 $\rightarrow$ 6, met en jeu des mécanismes semblables à ceux décrits pour la synthèse du glycogène.

2.2.4. Stockage de protéines grâce à l'endocytose

Chez les Amphibiens, par exemple, la protéine qui sert de précurseur aux constituants des plaquettes vitellines mentionnées plus haut, est nommée **vitellogénine** ; il s'agit d'une énorme lipoprotéine phosphorylée, qui est fabriquée dans le foie selon les mécanismes classiques décrits pour les protéines sécrétées (voir chapitre 9). Après passage dans le sang, la vitellogénine est conduite jusqu'aux follicules ovariens. Elle franchit la paroi des capillaires qui les entourent par **transcytose**, puis rentre dans les ovocytes grâce à un mécanisme d'**endocytose contrôlée**, mettant en jeu des récepteurs spécifiques et des vésicules recouvertes de clathrine (voir chapitre 6). De nombreuses vésicules d'endocytose contenant la vitellogénine fusionnent les unes avec les autres, formant une structure de grande taille, la plaquette vitelline, dont la membrane limitante dérive de la membrane plasmique de l'ovocyte. Au sein de chaque plaquette, le précurseur subit des événements de clivage protéolytique, et les protéines contenues dans les plaquettes sont en fait représentées par la **phosvitine** (phosphorylée) et la **lipovitelline** (lipoprotéine). Ces composés, qui constituent une réserve organominérale (énergie, acides aminés et acide phosphorique) pour le futur embryon, seront digérés au sein de l'organite lors du développement, grâce à l'intervention d'enzymes lysosomales (voir plus loin). Des phénomènes voisins existent chez les Invertébrés (certains Insectes, par exemple), bien qu'avec des modalités légèrement différentes.

2.3. Étapes initiales de la mobilisation des réserves

Les voies de dégradation mises en œuvre ne sont pas l'inverse des voies de synthèse qui ont été décrites plus haut. Une telle situation est fréquente dans le métabolisme et s'explique par le fait que ceci permet une grande spécificité et beaucoup de souplesse, non seulement au plan énergétique, mais aussi au niveau de la régulation de certaines étapes-clefs de ces voies. Chez les Animaux, celles-ci sont sous le contrôle de nombreuses hormones, chargées d'assurer des flux optimaux de métabolites au sein de l'organisme, et donc l'homéostasie de ce dernier. Nous rappellerons très brièvement le principe d'un tel contrôle dans le cas de la dégradation du glycogène.

2.3.1. Dégradation des lipides

Le début du processus de leur dégradation se déroule au sein du hyaloplasme, sous l'action de lipases qui décrochent tout d'abord les acides gras du glycérol. L'oxydation complète des acides gras, après leur découpage en chaînons dicarbonés, a lieu dans les mitochondries ; elle sera examinée dans le chapitre 10. Le glycérol, quant à lui, retourne vers la glycolyse, dans le cadre de la gluconéogenèse décrite plus haut.

2.3.2. Dégradation du glycogène

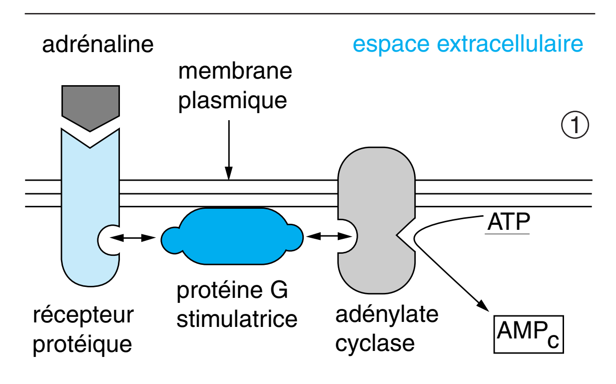
Ce composé est dégradé au sein du hyaloplasme en G 1-P, lequel est isomérisé en G 6-P, qui s'engage dans la glycolyse. La réaction consiste en une phosphorolyse des liaisons $\alpha 1 \rightarrow 4$, grâce à une **glycogène phosphorylase**, avec intervention d'acide phosphorique (Pi) :

$$\text{glycogène}_{n+1} + \text{Pi} \rightarrow \text{glycogène}_n + \text{G 1-P}$$

Comme cette dégradation commence simultanément au niveau de toutes les extrémités non réductrices de la molécule, et procède de façon séquentielle, une grande quantité de glucose est mobilisable en très peu de temps. À l'inverse de la synthèse, une **enzyme débranchante** est chargée

de supprimer les branchements dans la molécule. On rappelle ici que ces enzymes restent associées aux particules de glycogène, ce qui contribue à accélérer notablement le processus de dégradation.

La dégradation du glycogène chez les Vertébrés supérieurs, ainsi que sa synthèse, sont sous le contrôle de la glycémie sanguine, qui entraîne la sécrétion de diverses hormones stimulant ou inhibant l'un ou l'autre de ces phénomènes. Par exemple, en situation de glycémie élevée, la sécrétion d'**insuline** provoque l'inactivation de la phosphorylase et l'activation simultanée de la glycogène synthétase au niveau du foie et des muscles striés : le glucose est alors dirigé vers la synthèse de glycogène. En situation de glycémie basse, le **glucagon** et l'**adrénaline** ont des effets exactement inverses, et le glycogène fournit du glucose (qui est libéré dans le sang, dans le cas du foie). Au plan moléculaire et cellulaire, les événements en jeu sont d'une grande complexité et ne peuvent être détaillés ici. En bref, une cascade de réactions commence au niveau de la membrane plasmique des cellules concernées, qui possède des récepteurs pour les hormones mentionnées plus haut ; leur reconnaissance conduit (*via* la synthèse d'un « messager secondaire » nommé **AMP cyclique**, ou AMP_C) à des phénomènes de phosphorylation ou de déphosphorylation des enzymes, ce qui induit, selon les cas, leur activation ou leur inactivation. Cet ensemble de mécanismes constitue le processus désigné sous le nom de **transduction du signal**, défini dans le chapitre 5. L'exemple de l'activation de la glycogène phosphorylase par l'adrénaline est donné dans la *figure* 7.11 (voir aussi le chapitre 13 sur ce sujet).



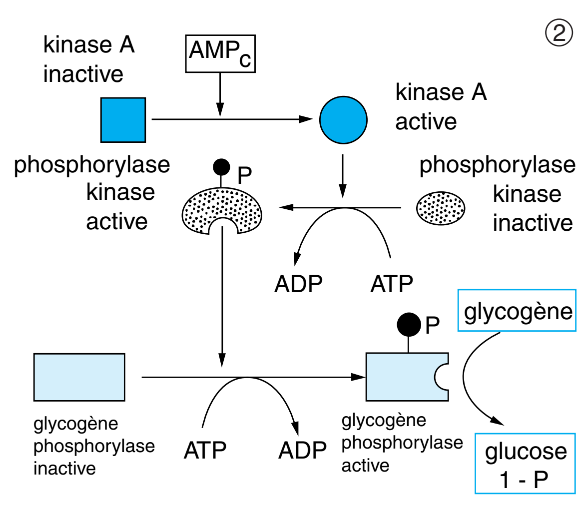


Figure 7.11

Étapes de la transduction du signal impliquée dans l'activation de la glycogène phosphorylase du muscle

Schéma simplifié récapitulant les conséquences de l'action de l'adrénaline. **(1)** Événements se déroulant au niveau de la membrane plasmique. **(2)** Événements cytoplasmiques de phosphorylation en cascade au sein du hyaloplasme grâce à des kinases (ou phosphorylases) déclenchés par l'AMP_C.

3. LES LYSOSOMES DES CELLULES ANIMALES, DES PROTISTES ET DES CHAMPIGNONS

Deux types de compartiments possédant des caractéristiques structurales voisines, et ayant des fonctions directement liées à la nutrition cellulaire et/ou au stockage de métabolites existent chez les Eucaryotes. Il s'agit, d'une part, des **lysosomes** des cellules animales, des Protistes et des Champignons, et d'autre part, des **vacuoles** des Végétaux. Chez les Protistes et les Animaux, les lysosomes (étymologiquement : particules qui détruisent) sont fondamentalement associés à la digestion intracellulaire d'éléments absorbés par les cellules grâce à l'endocytose ; chez les derniers, cependant, nous serons amenés à décrire des fonctions capitales, dérivées de cette fonction première, en rapport avec l'organogenèse et le renouvellement des tissus chez l'adulte. Lorsque les enzymes hydrolytiques sont sécrétées par exocytose, comme c'est typiquement le cas pour les Champignons, la digestion devient extracellulaire ; la nutrition est alors de type osmotrophe.

3.1. Mise en évidence expérimentale des lysosomes : un exemple atypique

De façon inhabituelle dans l'histoire de la biologie cellulaire, ces organites ont été mis en évidence par des techniques utilisant le fractionnement cellulaire et les tests biochimiques, avant d'avoir été décrits au plan cytologique. Leur découverte, vers 1950 (C. DE DUVE), s'est faite de la manière suivante. Lorsque l'activité spécifique de la phosphatase acide (voir 3.2.2.) est dosée dans des homogénats de foie de rat, celle-ci est d'autant plus élevée que ces derniers sont « maltraités », par rapport aux précautions habituellement prises dans les expériences d'enzymologie. Par exemple, l'homogénéisation dans de l'eau distillée et non pas dans un milieu osmotiquement équilibré, l'emploi de détergents, une agitation mécanique violente, développaient considérablement (× 10) l'activité enzymatique. De même, des cycles successifs de congélation/décongélation des extraits, ou des séjours prolongés à 4°C, connus pour altérer les protéines, avaient les mêmes conséquences. En fait, tous les traitements censés détériorer les organites avaient un effet stimulant sur cette enzyme, supposée jusque-là hyaloplasmique. La conclusion fut que cette activité était sans doute localisée dans des vésicules encore non identifiées, dont la destruction libérait le contenu et lui permettait de s'exprimer. Ce phénomène fut ensuite démontré pour de nombreuses autres activités de type hydrolases.

Les méthodes du fractionnement cellulaire, associées à l'utilisation de gradients continus de saccharose, très résolutifs, ont permis de séparer – avec difficulté cependant – ces vésicules des mitochondries et des peroxysomes (voir chapitre 10). Malgré leurs tailles assez différentes, ces trois types d'organites sédimentent dans les mêmes conditions de centrifugation différentielle. Le fait qu'ils possèdent des enzymes bien distinctes (enzymes marqueurs) a grandement facilité leur identification sur les gradients. La nature des enzymes caractéristiques de ces nouveaux organites se prêtant bien à la mise au point de tests cytoenzymologiques, y compris en microscopie électronique (voir encart suivant), ceux-ci furent rapidement visualisés au sein de toutes les cellules eucaryotiques.

3.2. Ultrastructure et composition chimique

3.2.1. Polymorphisme des lysosomes

La cytologie électronique montre que les lysosomes constituent un ensemble polymorphe de vésicules, aussi bien par leur taille, leur forme, que

ENCART TECHNIQUE

Détection des activités phosphatasiques dans des cellules vivantes ou fixées

Ces activités enzymatiques, nombreuses et très diverses dans toutes les cellules, sont particulièrement intenses au niveau des membranes ou au sein des lysosomes. Il s'agit d'estérases catalysant l'hydrolyse de monoesters de l'acide phosphorique (H_2PO_3-R) en donnant de l'acide phosphorique (H_3PO_4) et un alcool ou un phénol (R-OH). La détection de cette activité en microscopie photonique est complexe car il faut obtenir en fin de réaction un précipité opaque ou coloré. Le protocole est basé sur une série de plusieurs réactions couplées. Le tissu vivant (ou des coupes obtenues après des fixations douces, ou bien par les cryométhodes, qui préservent les activités enzymatiques) est incubé dans un mélange d'un phosphate organique (le glycérophosphate ou l'ATP, par exemple) et de nitrate de plomb. Le H_3PO_4 obtenu après hydrolyse est repris dans la réaction spontanée suivante :

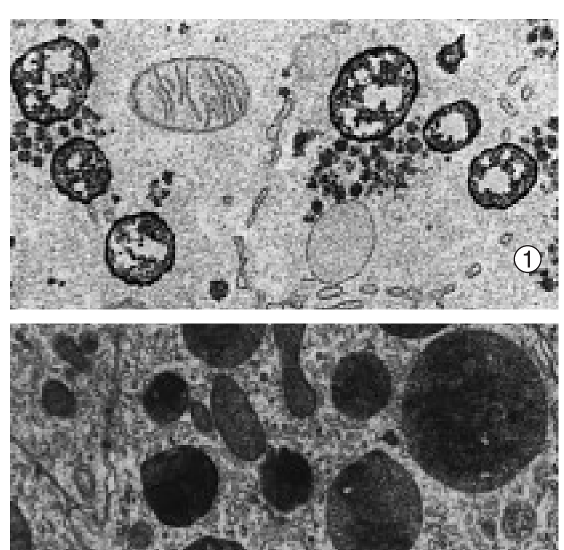
nitrate de plomb + H_3PO_4 $\rightarrow$ phosphate de plomb (insoluble)

Le précipité de phosphate de plomb s'accumule donc à l'endroit où l'enzyme agit, mais il est invisible en lumière naturelle. On peut cependant le transformer en un composé opaque en incubant la préparation dans une solution de sulfure d'ammonium qui, en réagissant avec le phosphate de plomb, conduit à la formation de sulfure de plomb noir, et donc visible. Ce type de méthode permet de localiser des phosphatases très variées car il suffit de changer la nature du substrat initial et d'adapter les conditions d'incubation pour faire fonctionner spécifiquement telle ou telle phosphatase. Pour la microscopie électronique, le protocole est plus simple car le précipité de phosphate de plomb est opaque aux électrons et d'emblée visible. Cette technique constitue le prototype des réactions de cytoenzymologie.

la nature du contenu de leur lumière ; une telle caractéristique explique que cette population n'ait pu être identifiée par les méthodes cytologiques classiques. Il s'agit de vésicules limitées par une membrane simple dont l'épaisseur est de 7,5 nm ; leur diamètre va de 50 nm à plusieurs micromètres (voir *figure* 7.12). Le contenu de la lumière, amorphe ou granulaire, souvent opaque aux électrons, est en général très hétérogène, y compris à l'intérieur d'une même cellule. On y observe parfois des débris d'organites ou de structures identifiables, tels que : réticulum endoplasmique, mitochondries, ribosomes, glycogène, etc. Enfin, l'aspect et l'abondance des lysosomes sont extrêmement variables selon les types cellulaires ou leur état physiologique. Peu nombreux dans les hépatocytes et les cellules rénales, on les observe en revanche en grand nombre dans les leucocytes nommés **neutrophiles polynucléaires**, dans lesquels ils sont également de grande taille (d'où le nom de granulocytes donné parfois à ces cellules).

3.2.2. Assortiment enzymatique des lysosomes

Ces organites se définissent donc plus par leurs propriétés biochimiques et fonctionnelles originales que par leur morphologie. On a montré que leur lumière contient plusieurs dizaines d'enzymes (> 50) : protéases, nucléases, glycosidases, lipases, phosphatases, etc., toutes des **hydrolases**, capables de dégrader la plupart des composés organiques connus (voir *tableau* 7.1). Ces enzymes ont en outre en commun de fonctionner avec un optimum de pH acide (pH 5 à pH 6). Les lysosomes sont manifestement impliqués dans des fonctions de digestion de substrats variés, d'origine intra- ou



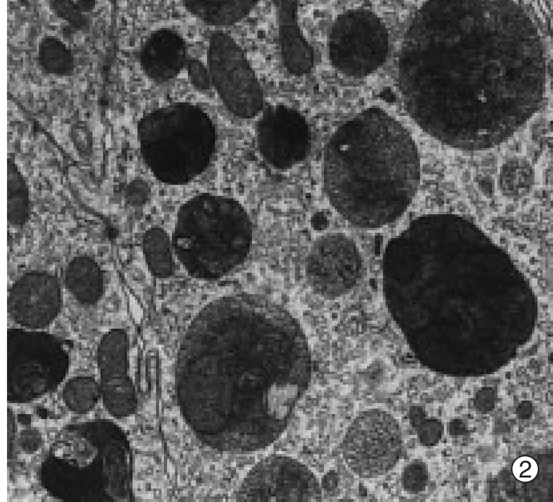


Figure 7.12

Lysosomes observés en microscopie électronique

(1) Détection cytoenzymologique de la phosphatase acide dans un filament de Champignon (× 18 000). **(2)** Lysosomes présents dans les entérocytes des larves d'Amphibien en cours de métamorphose (× 12 000). (Clichés Labo BV et J. Hourdry, Orsay).

Enzymes	Substrats
Protéases	
Cathepsines	protéines diverses
Collagénase	collagène
Nucléases	
ARNase acide	ARN
ADNase acide	ADN
Phosphatases	
Phosphatase acide	phosphomonoesters
Phosphodiestérase	phosphodiesters
Sulfatases	
Arylsulfatase	esters sulfatés
Chondrosulfatase	chondroïtine sulfate
Glycosidases	
Exoglycosidases	glycogène hétéropolysaccharides oligosaccharides à fucose, mannose ou acide sialique
Endoglycosidases	acide hyaluronique peptidoglycane
Lipases	
Lipases acides	triacylglycérols
Phospholipases	phospholipides
Céramidase	céramide
Hexosaminidase	gangliosides

Tableau 7.1

Diversité des hydrolases contenues dans les lysosomes des cellules animales

Quelques exemples choisis parmi la cinquantaine d'enzymes connues sont donnés, ainsi que leurs substrats les plus courants.

extracellulaire, comme nous le verrons plus loin. Ils représentent cependant une menace permanente pour la cellule, dans la mesure où leur membrane doit être elle-même résistante aux enzymes contenues dans la lumière, afin de protéger le cytoplasme de l'attaque de ces dernières. Lorsqu'une cellule meurt, les déséquilibres qui s'installent immédiatement en son sein entraînent la perte de cette résistance et une autolyse (autodestruction) spontanée se met en route, indépendamment de toute dégradation d'origine extérieure, microbienne, par exemple.

3.2.3. Structure et propriétés de la membrane des lysosomes

Cette membrane, de structure classique, possède plusieurs propriétés remarquables ; elle contient en particulier une protéine intrinsèque fonctionnant comme une **pompe à protons ATP dépendante**. Cette dernière, absente chez les lysosomes primaires (voir plus loin), est identique à celle des endosomes, dont elle dérive après fusion membranaire entre les deux types d'organites ; elle acidifie le pH de la lumière, dont la concentration en protons est jusqu'à 100 fois supérieure à celle du hyaloplasme. En outre, la membrane lysosomiale est plus perméable aux composés hydrophiles que la plupart des membranes cellulaires internes ; elle contient en effet de nombreuses **protéines porteuses**, ce qui facilite la diffusion des métabolites résultant des phénomènes d'hydrolyse qui se déroulent dans la lumière des lysosomes secondaires. Une dernière caractéristique importante de cette membrane, déjà signalée, est sa capacité à résister aux attaques enzymatiques ; cette propriété est probablement liée au fait que ses protéines intrinsèques sont très fortement glycosylées sur leurs domaines internes, formant un manteau protecteur qui diminue leur accessibilité aux lipases et aux protéases contenues dans la lumière.

3.2.4. Origine cellulaire des lysosomes

Cette origine est à rechercher dans de petites vésicules d'origine trans-golgienne, nommées **lysosomes primaires**, qui possèdent toutes les caractéristiques biochimiques des lysosomes typiques et réagissent, en particulier, aux mêmes tests de cytoenzymologie. Leur membrane et leur contenu protéique dérivent, comme nous le verrons dans le chapitre 9, du réticulum endoplasmique rugueux, au niveau duquel ils ont été initialement fabriqués. Après leur transfert dans l'appareil de Golgi, et tout au long de leur passage dans les différents saccules des dictyosomes, ces molécules subissent plusieurs modifications chimiques, parmi lesquelles des glycosylations. La vésiculisation des lysosomes primaires à partir des saccules golgiens nécessite l'intervention de la clathrine.

3.3. Diversité des rôles physiologiques

Les lysosomes représentent un compartiment original, dont le rôle a été initialement considéré comme marginal et peu «noble», en raison de la nature des enzymes qu'ils contiennent ; on a longtemps comparé ces organites à de simples estomacs cellulaires. Il a cependant été démontré qu'ils ont des activités très diverses, et qui s'avèrent fondamentales dans l'économie des cellules. Ils interviennent non seulement dans les phénomènes de digestion intracellulaire, qui sont associés à des fonctions générales (nutrition, renouvellement cellulaire, etc.), ou au contraire très spécialisées (synthèse et dégradation d'hormones, défense des organismes, etc.), mais aussi dans la digestion extracellulaire et le stockage de réserves. Il n'est donc pas étonnant que de nombreuses pathologies humaines, génétiques ou pas, soient associées au dysfonctionnement de ces structures.

3.3.1. Rôles dans la digestion intracellulaire

Ces fonctions des lysosomes peuvent être classées schématiquement en deux catégories, selon l'origine des substrats qui sont digérés : on distingue l'**hétérophagie**, qui consiste dans la digestion de substrats externes, et l'**autophagie**, qui concerne la digestion de substrats internes.

• L'**hétérophagie** est essentiellement associée aux fonctions de nutrition et de protection contre des organismes extérieurs. De nombreux Protistes phagotrophes (tels que les paramécies, ou les amibes), de même que des cellules spécialisées appartenant aux organismes pluricellulaires (choanocytes des Spongiaires, par exemple), sont capables d'absorber par endocytose, puis de digérer des molécules, des particules plus ou moins volumineuses, voire des cellules entières. Nous

avons vu, dans le chapitre 6, comment certaines macromolécules faisant l'objet d'une endocytose contrôlée par récepteur étaient dirigées vers les lysosomes, *via* les endosomes. Nous nous intéressons ici au phénomène de la **phagocytose**, dont le mécanisme est sensiblement différent de celui de la pinocytose, en raison de la nature et de la taille des objets absorbés (voir chapitre 6).

Dans le cas des globules blancs spécialisés dans la défense de notre organisme : les **macrophages** et les **neutrophiles polynucléaires**, les processus se déroulent de la façon suivante. Les Bactéries ayant envahi nos tissus et notre milieu intérieur sont généralement recouvertes d'anticorps sécrétés par les **lymphocytes B** (phénomène d'opsonisation, en rapport avec l'immunité humorale). Le contact est établi entre les deux cellules grâce à une interaction entre des récepteurs membranaires spécifiques, et un domaine exposé des anticorps collés sur les Bactéries, dit fragment Fc, qui est précisément reconnu (voir *figure* 7.13). La membrane plasmique du phagocyte enveloppe complètement la «proie» au moyen de pseudopodes ou de fines bandes de cytoplasme qui s'allongent et fusionnent à leurs extrémités pour former une vésicule d'endocytose de grande taille nommée **phagosome**, ou **vacuole de phagocytose** (voir *figure* 7.14). La phagocytose est un mécanisme complexe, car il ne suffit pas que cette proie ait été fixée et que les récepteurs soient présents dans la membrane du leucocyte, pour permettre une absorption complète : les anticorps doivent être uniformément répartis autour de la Bactérie-cible afin que le processus d'enveloppement soit complet ! Celui-ci consiste dans le recrutement d'un nombre croissant de récepteurs membranaires, qui semblent tirer la membrane avec eux. On utilise parfois l'image d'une «fermeture Éclair» pour expliquer comment les deux membranes s'accolent progressivement l'une à l'autre, avant que la cellule capturée ne soit complètement absorbée.

L'étape suivante consiste dans la rencontre de plusieurs lysosomes primaires avec le phagosome ; après fusion membranaire, le contenu enzymatique de ces lysosomes est déchargé dans la lumière de ce dernier. On obtient alors un **phagolysosome**, ou **lysosome secondaire**, au sein duquel les hydrolases acides vont digérer les substrats absorbés, en l'occurrence la Bactérie capturée. L'acidification importante du milieu, due à la présence de la pompe à protons apportée par la membrane de l'endosome, déclenche la digestion. Les petites molécules résultant de cette hydrolyse (sucres simples, acides aminés, etc.) traversent la membrane du lysosome secondaire et passent dans le hyaloplasme, où elles rejoignent celles qui sont fabriquées de manière endogène par la cellule, participant ainsi à la nutrition cellulaire. Grâce à l'utilisation de différents marqueurs suceptibles d'être phagocytés, facilement reconnaissables en microscopie électronique, il a été montré que plusieurs lysosomes secondaires sont capables de fusionner entre eux. Lorsque des résidus non digestibles subsistent dans la lumière de ces organites, on obtient ce qu'on appelle des **corps résiduels**, dont le contenu est rejeté dans le milieu

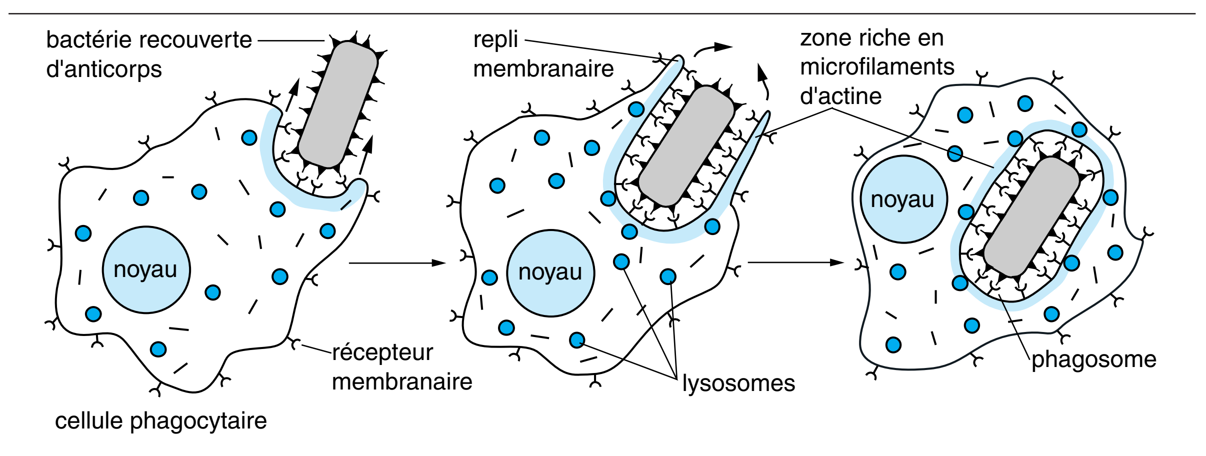


Figure 7.13

Interprétation schématique du phénomène de phagocytose

Le mécanisme permettant le recouvrement et la phagocytose de grosses proies (ici une Bactérie) met en jeu des récepteurs membranaires. La capture progressive des molécules-cibles de la surface de la proie par les récepteurs situés eux-mêmes à la surface de fins pseudopodes évoque un mécanisme de «fermeture éclair».

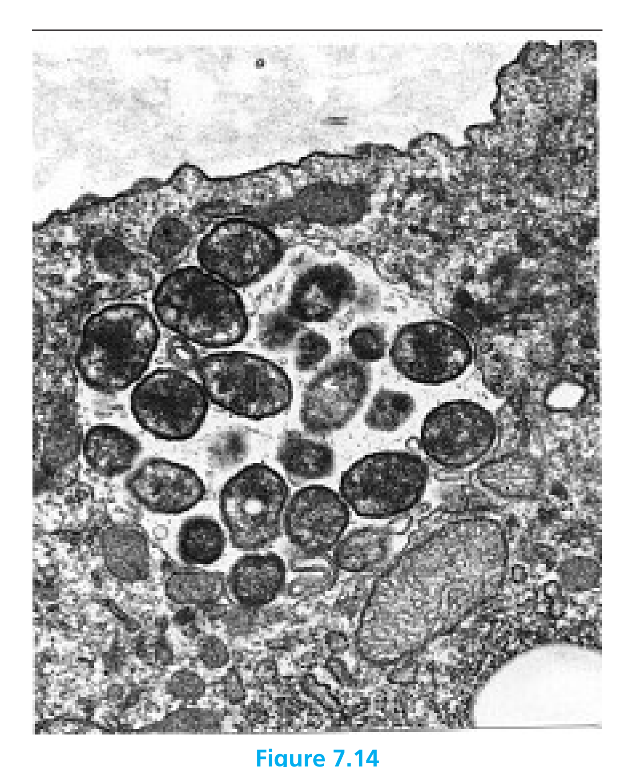


Figure 7.14

Vacuole de phagocytose chez un Protiste

Ce phagosome contient plusieurs Bactéries qui ont été capturées par la cellule. Noter la présence d'une mitochondrie à crêtes tubulaires dans le cytosol (Cliché R. Charret, Labo BC4, Orsay).

extracellulaire par exocytose, ou qui sont stockés à l'intérieur de la cellule. Un exemple spectaculaire est celui des **corps myéliniques**, où s'accumulent des « tourbillons » de matériel lipidique d'origine membranaire ; ceci est dû à la faible activité des lipases lysosomales. On ignore encore à peu près tout des mécanismes qui permettent aux lysosomes primaires de fusionner avec les vésicules de phagocytose, et non avec un quelconque système membranaire dans la cellule, ce qui serait dramatique pour celle-ci.

De même qu'ils nous défendent contre les infections, en ingérant les micro-organismes nuisibles, les globules blancs phagocytaires débarrassent nos tissus des cellules vieillissantes ou endommagées : par exemple, les hématies, dont la durée de vie est de 120 jours seulement, sont phagocytées lorsque leur âge limite est atteint, et ce à raison de 10^{11} unités par jour ! Les poussières, les suies, les goudrons, les Virus que nous respirons continuellement sont absorbés par des macrophages qui se « promènent » au plus profond des alvéoles de nos poumons. Lorsqu'ils sont par trop engorgés de déchets indigestes, ils meurent et sont éliminés avec le mucus qui remonte le long des trachées, dont les cellules épithéliales sont ciliées. Il faut signaler ici l'existence de Bactéries qui, après phagocytose, ne peuvent être digérées par les enzymes lysosomales, car la composition chimique de leur enveloppe les protège contre les hydrolases. Ces micro-organismes pathogènes prolifèrent alors au sein des phagosomes ; c'est le cas des agents de la tuberculose, de la lèpre, ou de la listériose.

La nutrition cellulaire faisant intervenir la phagocytose et les lysosomes n'est pas réservée aux seuls Protistes, dont les grosses **vacuoles digestives** ont été décrites depuis longtemps (voir *figure* 7.14 et 7.15). On rappelle que de nombreux Invertébrés, et même des Vertébrés inférieurs (certains Poissons), utilisent ce processus au niveau de leur cavité digestive ou de leur intestin pour assurer tout ou partie de leur alimentation (voir chapitre 6). Dans le cas de la carpe, par exemple, qui ne possède pas d'estomac différencié, la digestion incomplète des aliments au sein de l'intestin, en

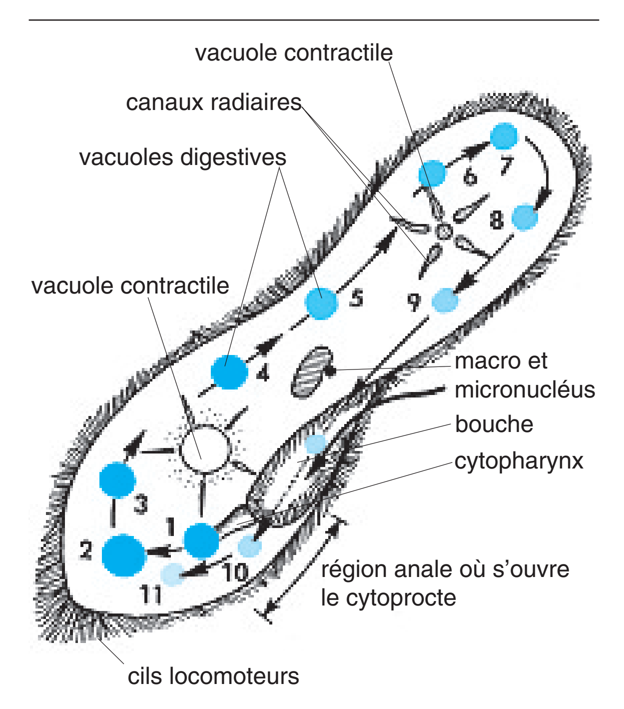


Figure 7.15

Cycle des vacuoles digestives chez une paramécie

Ces organites se forment dans la région basale du cytopharynx et éclatent, sous forme de corps résiduels, au niveau du cytoprocte (défécation cellulaire). Les produits de la digestion, qui a lieu tout au long du trajet grâce aux enzymes lysosomales déversées dans la lumière des vacuoles, passent dans le hyaloplasme et constituent les nutriments de la cellule.

raison d'une insuffisance en enzymes digestives, est compensée par une intense phagocytose de la part des entérocytes.

D'autres exemples uniques d'hétérophagie sont décrits chez les Mammifères. Il est connu que les hépatocytes sont capables de capturer et de dégrader des protéines du plasma sanguin, ou que les cellules rénales des tubes contournés proximaux assurent de la même façon la réabsorption des petites protéines qui filtrent au niveau du glomérule rénal. Dans ce cas, leur endocytose au niveau de ces cellules est suivie d'une digestion dans les lysosomes, ce qui permet la récupération, sous forme d'acides aminés, d'une bonne partie de ces molécules qui, sans cela, seraient perdues avec l'urine. C'est également un processus d'hétérophagie qui participe, au sein de la glande thyroïde, à la fabrication des hormones thyroïdiennes : les **thyroxines** T_3 et T_4. En bref, les cellules qui élaborent ces hormones (**thyréocytes**) sécrètent une protéine : la **thyroglobuline**, qui est accumulée dans la lumière des follicules thyroïdiens (voir les mécanismes moléculaires de la sécrétion dans le chapitre 9). Sous l'action d'un stimulus hormonal (TSH hypophysaire), cette dernière est ensuite intériorisée par ces mêmes cellules, puis dirigée vers leurs lysosomes, où elle est partiellement dégradée. Parmi les produits de cette digestion, figurent les thyronines iodées actives, qui sont déversées dans le milieu intérieur, au pôle opposé de la cellule (voir *figure* 7.16).

• L'**autophagie** consiste dans la digestion, par les lysosomes, de matériel interne aux cellules elles-mêmes. Dans certaines situations, que nous préciserons plus loin, on observe de gros lysosomes secondaires qui sont emplis de débris d'organites identifiables, mais visiblement en cours de digestion ; on parle alors de **vacuoles autophagiques**, ou **autophagosomes**. Des lames de réticulum endoplasmique lisse séquestrent des territoires entiers de cytoplasme, en les enveloppant complètement, puis des lysosomes primaires viennent

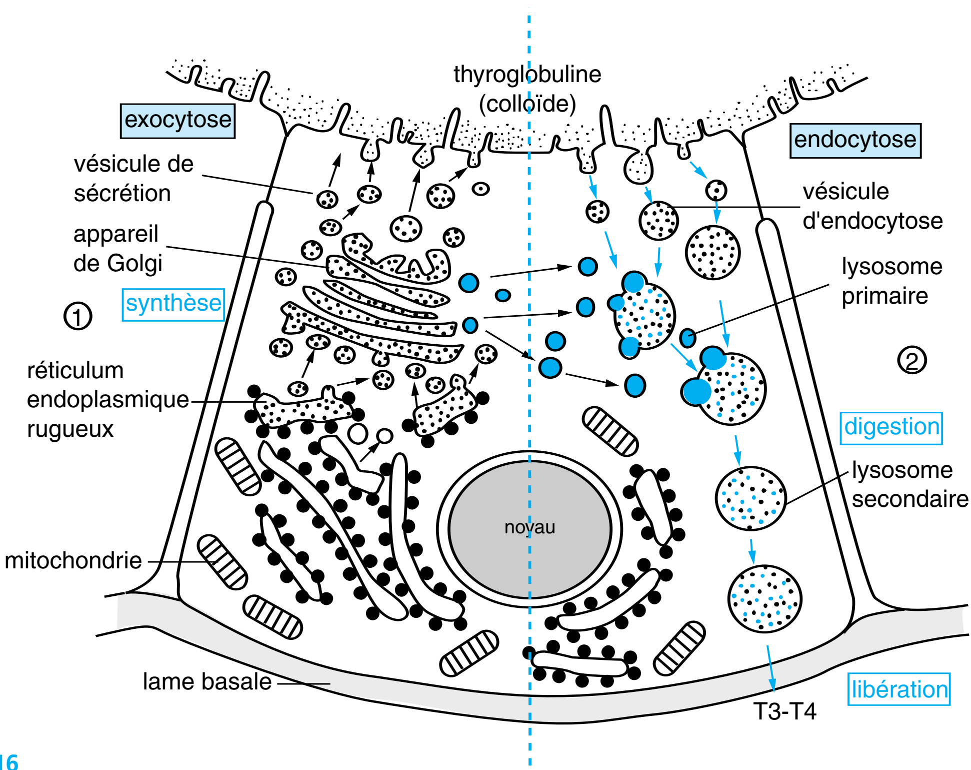


Figure 7.16

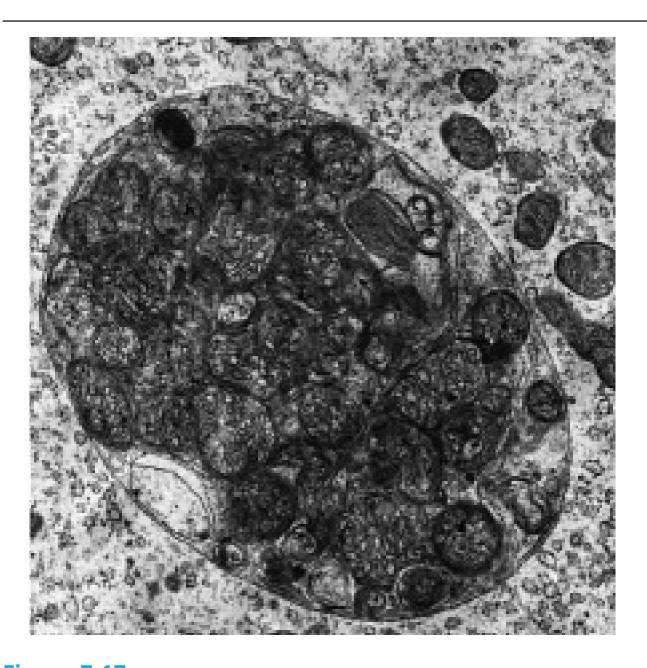
Étapes de la formation des hormones thyroïdiennes

La glande thyroïde est constituée de follicules limités par un épithélium unistratifié formé de thyréocytes. **(1)** Exocytose de la thyroglobuline (colloïde) dans la lumière de la glande. **(2)** Endocytose de la colloïde par ces mêmes cellules, suivie de sa digestion partielle au sein des lysosomes, puis de la libération des hormones thyroïdiennes T_3 et T_4 dans le milieu extérieur, par diffusion. Les résidus tyrosine de la thyroglobuline sont iodés dans la lumière grâce à une enzyme appropriée.

fusionner avec ces vacuoles, selon le mécanisme habituel, après quoi la digestion s'engage. Le déterminisme exact de ces mécanismes, qui implique nécessairement un contrôle subtil afin que toute la cellule ne soit pas détruite, reste inconnu.

Ce phénomène très sélectif a une ampleur variable selon les types de cellules, chez les êtres pluricellulaires. On considère qu'il se déroule en permanence dans tous les tissus, mais de façon limitée ; il est très bien documenté dans le cas des hépatocytes, des cellules rénales et du tissu nerveux. Le taux de renouvellement dans les hépatocytes a été estimé à travers la mesure de la demi-vie des différents constituants cellulaires, après leur marquage radioactif. On trouve une valeur de dix jours, par exemple, pour les mitochondries, de cinq jours pour les ribosomes et de trois jours pour les peroxysomes. Bien que n'étant pas détruites à la même vitesse, toutes les structures cellulaires sont renouvelées un grand nombre de fois au cours de la vie d'un hépatocyte, qui est estimée à plus de six mois. L'autophagie contribue ainsi au renouvellement constant et au recyclage de la matière vivante, et joue à ce titre un rôle fondamental, attesté par l'existence de diverses maladies génétiques très graves (voir plus loin). En cas de carence alimentaire grave (jeûne prolongé, volontaire ou non), l'autophagie est une façon pour l'organisme de survivre pendant de longues périodes (près de deux mois chez l'Homme).

En revanche, dans certains tissus qui présentent une involution rapide, ce processus peut conduire en très peu de temps à la destruction totale des cellules concernées (**histolyse**). On connaît chez les Animaux de nombreux exemples de ce processus de dégénérescence cellulaire, nommé **mort cellulaire programmée** ou apoptose, au cours du développement embryonnaire ou larvaire (voir chapitre 12). C'est lui qui est responsable de la destruction de l'intestin larvaire, ou de la disparition des branchies et de la queue du têtard, lors de la métamorphose des Amphibiens anoures (voir *figure* 7.17). De même, chez les embryons de Mammifères, la formation des doigts au cours de l'organogenèse de la main, ou le percement des paupières, sont liés à des phénomènes d'histolyse dus aux lysosomes. Les débris cellulaires résultant de ces processus sont enfin digérés par des cellules phagocytaires. Chez l'adulte, la régression cyclique de certains tissus, comme l'involution de la muqueuse utérine lors du cycle menstruel ou la régression des glandes mammaires après la lactation, relèvent des mêmes processus. Des phéno-



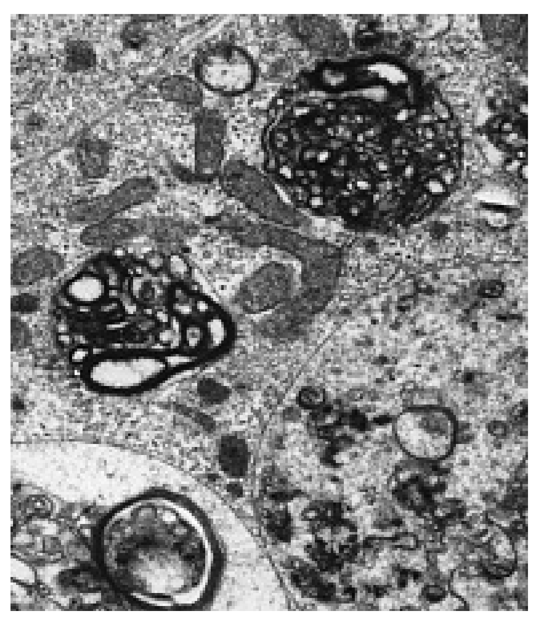


Figure 7.17

Lysosomes secondaires et corps résiduels

Ces structures de grande taille sont observées en microscopie électronique dans les cellules de l'intestin larvaire d'Amphibien en cours de dégénérescence, lors de la métamorphose (noter les figures « myéliniques » dans le cliché de droite). Grossissement × 12 500. (Clichés J. Hourdry, Orsay).

mènes voisins sont décrits lors de la métamorphose des Insectes (par exemple, l'involution des glandes séricigènes chez le ver à soie). La *figure* 7.18 récapitule les principales voies conduisant aux lysosomes chez les cellules animales.

3.3.2. Rôles dans la digestion extracellulaire

Il s'agit d'un phénomène moins fréquent que la digestion intracellulaire, au cours duquel les enzymes lysosomales sont émises par exocytose à l'extérieur des cellules ; ceci a pour conséquence la dégradation des composants situés à proximité immédiate de ces dernières. On comprend donc que l'ampleur de ce processus soit limitée chez les organismes pluricellulaires, et réservée à certaines situations exceptionnelles.

Chez les Champignons, qui sont des organismes hétérotrophes osmotrophes, la nutrition implique la dégradation des substrats extracellulaires au moyen d'hydrolases lysosomales. Diverses protéases, cellulases, etc., sont sécrétées par les filaments mycéliens, et les molécules simples issues de la digestion de la matière organique externe (le plus souvent morte : **saprophytisme**) sont réabsorbées et utilisées pour le métabolisme.

Chez les Vertébrés, des phénomènes de résorption des matrices extracellulaires de divers tissus sont liés à la sécrétion de protéases d'origine lysosomale. On peut citer les exemples classiques du cartilage et de l'os, qui font l'objet d'un remaniement profond et contrôlé. Chez l'embryon, on a montré *in vitro* que les **chondrocytes** (cellules du cartilage) sécrètent des protéases (cathepsines) et des hyaluronidases, qui digèrent la volumineuse matrice extracellulaire, riche en protéoglycanes, caractéristique de ce tissu (voir chapitre 14). Chez l'adulte, les **ostéoclastes** sont des cellules géantes plurinucléées qui détruisent la matrice organominérale des os, grâce à la sécrétion d'acide et d'enzymes, au cours du remodelage permanent qui caractérise ces derniers. Ici aussi, la phagocytose est un moyen pour ces cellules de se débarrasser des débris dont elles sont directement responsables au cours de leur progression au sein du « vieil os » (que les **ostéoblastes** remplaceront), tout en leur permettant de se nourrir.

Il faut enfin signaler une structure originale, d'origine lysosomale, présente chez de nombreux

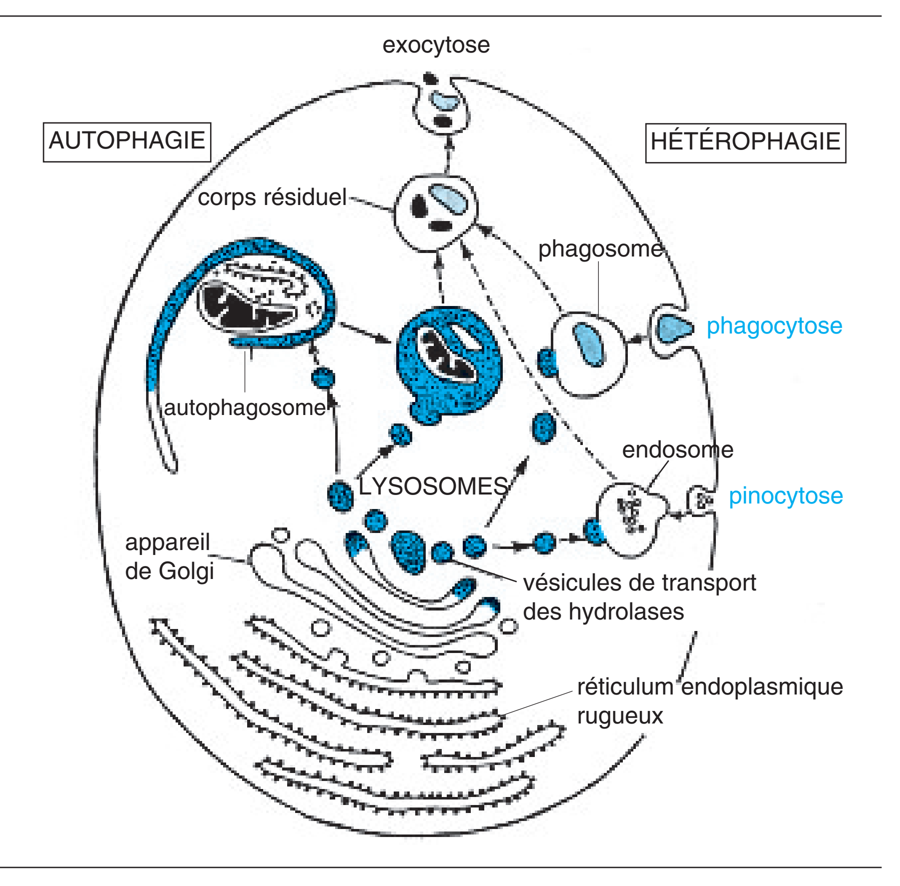


Figure 7.18

Divers modes de formation des lysosomes chez les Animaux

Schéma récapitulant les principales voies qui conduisent le matériel extra- ou intracellulaire vers les lysosomes. Les hydrolases lysosomales, fabriquées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, sont enfermées dans de petites vésicules golgiennes : lysosomes primaires. Celles-ci fusionnent avec des vésicules plus ou moins grosses qui ont trois origines possibles : pinocytose, phagocytose et autophagie ; on obtient ensuite des lysosomes secondaires.

spermatozoïdes : la **vésicule acrosomale**, située au-dessus du noyau, et dont le rôle dans la fécondation est capital. La libération du contenu de cet unique lysosome géant par exocytose, permet la lyse des enveloppes entourant l'ovule (gangue gélatineuse, membrane vitelline), et contribue ainsi à la rencontre et la fusion des gamètes.

3.3.3. Pathologies lysosomales humaines

De nombreuses pathologies humaines sont liées à des dysfonctionnements des lysosomes ; ceux-ci sont de deux types : 1) soit les hydrolases sont libérées de façon anormale, et en abondance dans le hyaloplasme, pouvant entraîner la mort de la cellule, 2) soit l'équipement enzymatique de ces organites est défectueux, pour des raisons génétiques, ce qui a des conséquences toujours graves pour l'organisme. On connaît diverses conditions environnementales dans lesquelles les lysosomes sont fragilisés et conduits à libérer leur contenu dans le hyaloplasme, avec comme conséquence des altérations cellulaires plus ou moins graves. Il s'agit des situations de stress cellulaire, consécutives à un état de choc : hypoxie ou hyperoxie, acidose, intoxications variées. Certains composés chimiques sont connus pour fragiliser ou stabiliser *in vitro* la membrane lysosomale. Deux exemples de maladies lysosomales sont donnés dans l'encart suivant.

On connaît par ailleurs plusieurs dizaines de maladies génétiques humaines liées à l'absence ou à la déficience d'une enzyme lysosomale. Compte tenu du rôle de ces organites dans le renouvellement constant des constituants cellulaires, ces anomalies auront, à terme, des conséquences graves liées à l'accumulation de composés non dégradés au sein de la cellule. S'ils ne sont pas évacués par les cellules, les corps résiduels formés s'hypertrophient, envahissent le hyaloplasme et perturbent considérablement le fonctionnement normal des cellules. Ces maladies, qui ne se manifestent donc que progressivement au cours du développement des individus, sont appelées **maladies de surcharge**. On peut citer, à titre d'exemples, la **mucolipidose de type II**, très rare, et les **maladies de Hurler** et **de Tay-Sachs** (voir chapitre 9).

La première correspond à un défaut d'adressage (voir plus loin) des enzymes lysosomales vers ces organites, chez les fibroblastes ; ceci a deux conséquences : la plupart des hydrolases sont absentes de ces organites, mais sont sécrétées et se retrouvent dans le sang des patients ! Un syndrome de surcharge extrême est donc observé dans les cellules affectées, sous forme de grosses inclusions cytoplasmiques. De façon étonnante, d'autres tissus de l'organisme ne sont pas touchés par l'anomalie, ce qui témoigne de la complexité des mécanismes qui président à l'adressage des protéines vers leurs compartiments destinataires.

Les deux autres maladies correspondent à la déficience d'une seule activité enzymatique : une enzyme responsable de la dégradation des glycosaminoglycanes (voir chapitre 14) dans le premier

Encart biomédical

Exemples de maladies lysosomales non génétiques : la silicose et la goutte

Ces deux maladies sont dues à l'ingestion, par les granulocytes ou les macrophages, de particules qui provoquent l'altération de la membrane des lysosomes secondaires, et la libération des hydrolases qu'ils contiennent, avec les conséquences qu'on imagine. La silicose, maladie professionnelle des mineurs qui a tué et tue encore un grand nombre d'entre eux, est provoquée par l'inhalation de particules microscopiques de silice. Celles-ci sont phagocytées par les macrophages alvéolaires chargés du nettoyage des poumons, qui les dirigent vers leurs lysosomes. La forme en aiguille et la rigidité de ces particules minérales endommagent la membrane lysosomale, qui est rapidement rompue ; ceci entraîne la lyse des cellules et la libération des hydrolases dans le milieu extracellulaire. Outre des lésions des bronches et des poumons, la conséquence de ce phénomène est la stimulation de la fabrication de collagène par les fibroblastes pulmonaires ; il s'en suit une fibrose du parenchyme pulmonaire et une perte considérable des capacités respiratoires des individus. L'asbestose est une pathologie voisine liée à l'inhalation de fibres d'amiante.
La goutte est une pathologie dont les causes sont identiques. Les malades ont, à l'origine, des troubles du métabolisme des purines, dont la conséquence est la production de cristaux d'urate de sodium dans le liquide synovial des articulations. Ces cristaux sont normalement phagocytés par les granulocytes, avec les mêmes conséquences cellulaires que celles décrites dans le cas de la silicose ; une réaction inflammatoire s'en suit, responsable de douloureuses crises d'arthrite.

cas, et une hexosaminidase chargée de détruire spécifiquement un glycolipide membranaire (ganglioside G_{M2}) dans le second. Ce dernier composé est particulièrement abondant dans la membrane plasmique des cellules du système nerveux central (voir chapitre 5) ; comme il ne peut plus être dégradé dans les lysosomes, alors qu'il continue d'être synthétisé, il s'accumule au sein de corps résiduels dont la taille et le nombre augmentent au cours du temps, dans les neurones. Les bébés atteints sont parfaitement normaux à la naissance, mais des désordres neurologiques s'installent rapidement : détériorations motrices, retard mental grave ; la mort, inéluctable, survient entre 3 et 5 ans. Un diagnostic prénatal, réalisé sur des cellules du liquide amniotique, permet de savoir si l'enfant sera atteint ou pas.

3.3.4. Adressage des protéines vers les lysosomes

La question est de savoir comment l'ensemble des hydrolases caractéristiques des seuls lysosomes, se trouve réuni au sein d'une même catégorie de vésicules, et exclu du processus sécrétoire chez les Animaux. Étant donné le caractère éminemment dangereux de ces enzymes vis-à-vis des autres constituants cellulaires, il importe que les mécanismes d'empaquetage soient très précis, y compris pour que des protéines étrangères à ces organites n'y soient pas entraînées, ce qui les condamnerait à être digérées. Ce problème général, dit d'**adressage des protéines** vers un compartiment cellulaire donné, est capital en biologie cellulaire ; il est traité en détail dans le chapitre 9.

4. LES VACUOLES DES CELLULES VÉGÉTALES

Ce développement ne concerne que les **vacuoles** des Végétaux verts, qui sont les mieux connues au plan physiologique, mais il faut se souvenir qu'elles existent aussi chez les Algues et les Champignons. À ce sujet, il faut signaler que les recherches conduites chez la levure de bière, dont l'étude génétique est très développée, ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans le phénomènes de stockage ou de mobilisation de réserves au sein de la vacuole. Chez les Végétaux, les fonctions de cette dernière, dont le volume est parfois considérable, sont fondamentales et très diverses ; parmi celles-ci, nous analyserons plus spécifiquement son rôle de stockage de métabolites ou de macromolécules, à court ou long terme.

4.1. Organisation générale et importance des vacuoles

4.1.1. Le compartiment vacuolaire

La vacuole constitue le compartiment le plus volumineux (jusqu'à 80 % du volume total) des cellules végétales différenciées, qui n'en possèdent généralement qu'une ; celle-ci résulte de la «fusion» de nombreuses vacuoles de petite taille, au cours de leur différenciation. La microscopie électronique montre que la vacuole est séparée du hyaloplasme par une membrane simple nommée **tonoplaste** ; de façon habituelle, les vacuoles ne contiennent pas d'éléments figurés et la simple analyse cytologique n'apporte aucun renseignement sur leur composition et les fonctions qu'elles assurent (voir *figure* 7.19). Ce fait est à l'origine de l'idée, qui a persisté jusqu'à une époque récente,

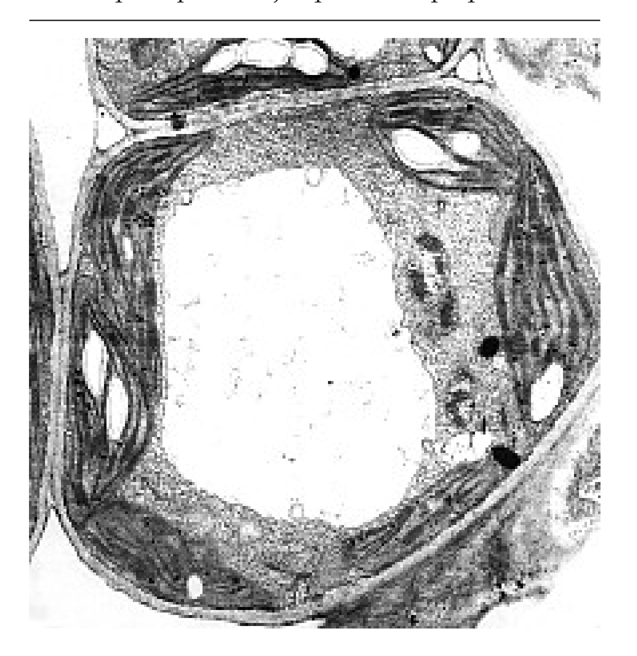


Figure 7.19

Aspect de la vacuole dans une cellule végétale

Coupe de cellule de parenchyme photosynthétique d'euphorbe (microscopie électronique × 5 000).
Noter les trois constituants caractéristiques des cellules chlorophylliennes différenciées : paroi, chloroplastes et vacuole. (Cliché J. Orcival, Orsay).

que les vacuoles constituaient un compartiment physiologiquement inerte, une simple réserve d'eau, capable seulement d'échanger cette molécule et quelques ions avec le milieu extérieur, selon les lois de la diffusion.

Il apparaît actuellement que la vacuole est un organite très polyvalent, dont le contenu varie, non seulement en fonction de l'espèce, mais aussi en fonction des types cellulaires et de leur état physiologique. De nombreuses fonctions lui sont reconnues, touchant à tous les domaines de la vie des cellules et des organismes végétaux ; elle assure, en particulier :

– la turgescence permanente des cellules, permettant ainsi la rigidité des tissus et le port dressé des végétaux herbacés, qui ne possèdent pas de structures de soutien (bois) ;
– la croissance en longueur de nombreux organes végétaux (tiges, racines), par allongement rapide des cellules (20-70 µm par heure), en rapport avec les échanges d'eau, comme précédemment ;
– les mouvements de certains organes (feuilles, tiges), même s'ils n'ont pas l'ampleur, la rapidité et la signification observée chez les Animaux ;
– le stockage à court ou long terme de composés servant de réserves (ions, petites molécules organiques et même macromolécules), pouvant être mobilisés en fonction des besoins grâce à l'existence d'une collection importante de transporteurs membranaires et d'enzymes appropriées ;
– le stockage à long terme, voire définitif, de produits secondaires du métabolisme, parfois considérés comme des déchets cellulaires, mais dont les rôles semblent en fait importants à l'échelle des organismes (anthocyanes ; voir plus loin).

Parmi toutes ces fonctions, dont la plupart relèvent de la physiologie végétale, on ne retiendra ici que celle de stockage, car il existe une dynamique importante au sein des cellules, concernant les phénomènes de nutrition et de croissance, à travers les échanges entre les vacuoles et plusieurs autres compartiments. Cette dynamique met en œuvre des phénomènes de transport (par protéines porteuses ou exocytose) et des mécanismes moléculaires d'adressage des protéines semblables à ceux décrits dans les chapitres 6 et 9.

4.1.2. Approche expérimentale. Caractéristiques des vacuoles

Les premières tentatives d'isolement de vacuoles datent de 1885 (H. de Vries) ; elles ont démontré qu'il s'agissait bien d'une véritable structure cellulaire, et non pas d'une simple cavité au sein du hyaloplasme. Les données modernes sur les vacuoles résultent de diverses approches, une des premières étant la cytoenzymologie, qui ont montré qu'elles contiennent plusieurs activités enzymatiques les rapprochant des lysosomes des cellules animales. La possibilité de les isoler en masse et de les purifier, comme n'importe quel autre organite cellulaire (même si les techniques sont très délicates et tout à fait spécifiques, en raison de leur taille et de leur fragilité), a ouvert la voie à de nombreuses analyses biochimiques, physiologiques et même électrophysiologiques.

Le contenu des vacuoles diffère de façon importante, quantitativement et qualitativement, de celui du hyaloplasme ; un phénomène très important de concentration de nombreux métabolites témoigne de l'existence de mécanismes actifs de transport semblables à ceux décrits au niveau de la membrane plasmique (voir chapitre 6). De plus, les potentiels osmotiques doivent être équilibrés de part et d'autre du tonoplaste, sous peine de voir celui-ci éclater, en raison de sa faible résistance mécanique. Les vacuoles concentrent, à des degrés divers, des ions (Mg^{2+}, Ca^{2+}), des oses et des osides, des acides organiques ou aminés et des macromolécules (protéines, glycoprotéines et polysaccharides). Ce contenu varie en fonction de l'espèce, du type cellulaire et des conditions physiologiques, certains composés pouvant faire l'objet d'échanges très rapides avec le hyaloplasme. Même dans les cellules banales, on démontre qu'il existe des fluctuations quotidiennes de la concentration de plusieurs molécules (le saccharose, l'acide malique), au sein des vacuoles, en rapport direct avec la photosynthèse et le rythme nycthéméral.

4.2. Rôle physiologique de stockage

Deux grandes catégories de composés font l'objet de stockage dans les vacuoles :

– ceux qui sont emmagasinés réversiblement, pendant des temps pouvant atteindre plusieurs mois, et qui résultent du métabolisme de base, commun à toute cellule. Il s'agit en général de petites molécules (métabolites primaires), ou bien de macromolécules ; ces composés sont utilisés comme des réserves de carbone et d'énergie, ou d'atomes particuliers (N, P) ;

– ceux qui y sont définitivement immobilisés, soit parce que ce sont des composés nocifs pour la vie de la cellule, soit car ils ont une signification autre que celle de nutriment.

4.2.1. Stockage de métabolites primaires

Ils sont fournis par le métabolisme intermédiaire ou énergétique, et sont essentiellement représentés par les sucres, les acides organiques et les acides aminés. Ces molécules sont accumulées dans la vacuole grâce à des systèmes de transport spécifiques (voir plus loin), et elles peuvent aisément être récupérées par le hyaloplasme et «réinjectées» dans l'activité cellulaire ; leurs mouvements sont rapides, rythmiques, avec une périodicité parfois quotidienne en rapport, comme on le verra plus loin, avec l'activité photosynthétique du tissu. On peut citer, par exemple :

– le **saccharose**, qui existe à l'état dissous dans les vacuoles, à des concentrations pouvant être élevées (15 à 20 %). Il constitue le sucre de canne ou de betterave ;
– les **acides carboxyliques**, qui appartiennent essentiellement au cycle de Krebs (acide citrique, isocitrique, etc.) ; parmi ceux-ci il faut signaler l'**acide malique**, un acide dicarboxylique en C4, dont le rôle est important dans le contrôle du pH intracellulaire. Nous en reparlerons au sujet des plantes dites CAM (voir plus loin) ;
– les **acides aminés**, parmi lesquels on citera la phénylalanine et la tyrosine, dans les feuilles des Légumineuses, ou l'arginine et la lysine chez la levure ou l'hévéa ;
– l'**acide oxalique** $(COOH)_2$, produit indirect de la photosynthèse, qui a un statut à part, car il est stocké sous forme de sel, souvent insoluble, et sa réutilisation est probablement très lente (voir chapitre 10).

4.2.2. Stockage de macromolécules

Deux catégories principales de macromolécules sont l'objet d'un stockage réversible, à long terme, au sein des vacuoles : les polysaccharides et les protéines, souvent glycosylées. L'**inuline** est un polysaccharide soluble de faible masse moléculaire, propre à quelques familles : Composées (artichaut, salsifis, topinambour, dahlia), Campanulacées et Liliacées. C'est un polymère linéaire constitué de résidus fructose (fructosane), qui est stocké à l'état dissous dans les vacuoles ; on le trouve dans les tubercules, les racines, les bulbes, où il existe à l'exclusion de l'amidon. Il constitue, au même titre que ce dernier, des réserves permettant à la plante de franchir la mauvaise saison (plantes vivaces ou bisannuelles).

Dans les graines déshydratées, les réserves protéiques se présentent sous forme d'inclusions solides limitées par une membrane, et nommées **grains d'aleurone** ou **corps protéiques** (situés dans les cellules de l'embryon ou de l'albumen). Ces structures dérivent de vacuoles classiques, après déshydratation ; celles-ci se fragmentent et se déshydratent progressivement, tout en accumulant une grande quantité de protéines, ainsi que des composés nommés phytates (hexaphosphates d'un polyalcool : l'inositol). Au sein des grains d'aleurone, on observe une ségrégation de ces constituants, faisant apparaître des globules réfringents (**globoïdes**) constitués de phytates insolubles, au milieu d'une matrice protéique parfois cristallisée localement (**cristalloïde**) ; les corps protéiques, moins différenciés, contiennent uniquement des protéines (voir *figure* 7.20). Ces protéines de réserve, qui constituent jusqu'à 70 % de la masse sèche de certaines graines, sont connues sous les noms de **globulines** chez les Légumineuses (phaséoline du haricot), ou de **prolamines** et de **glutélines** chez les céréales. Les mécanismes de leur synthèse et de leur accumulation dans les vacuoles seront évoqués plus loin et dans le chapitre 9.

Les tests cytochimiques montrent que les vacuoles contiennent, outre ces réserves, de nombreuses hydrolases, semblables à celles des lysosomes des Animaux, mais sous une forme inactive. Lors de la germination de la graine, qui peut se produire plusieurs mois ou plusieurs années après sa formation, le processus de réhydratation entraîne des événements inverses : gonflement des grains d'aleurone ou des corps protéiques, solubilisation de leur contenu et enfin digestion des réserves emmagasinées. Celle-ci est due à l'action des hydrolases déjà présentes, mais activées, et à celle de nouvelles enzymes, acquises secondairement par les vacuoles. Les produits de la digestion traversent le tonoplaste et participent à la croissance de l'embryon, encore hétérotrophe à cette étape du développement.

4.2.3. Stockage de métabolites secondaires

Ces composés, d'une grande diversité, dérivent de voies métaboliques spécifiques à certains groupes ou certaines espèces végétales. Ils appar-

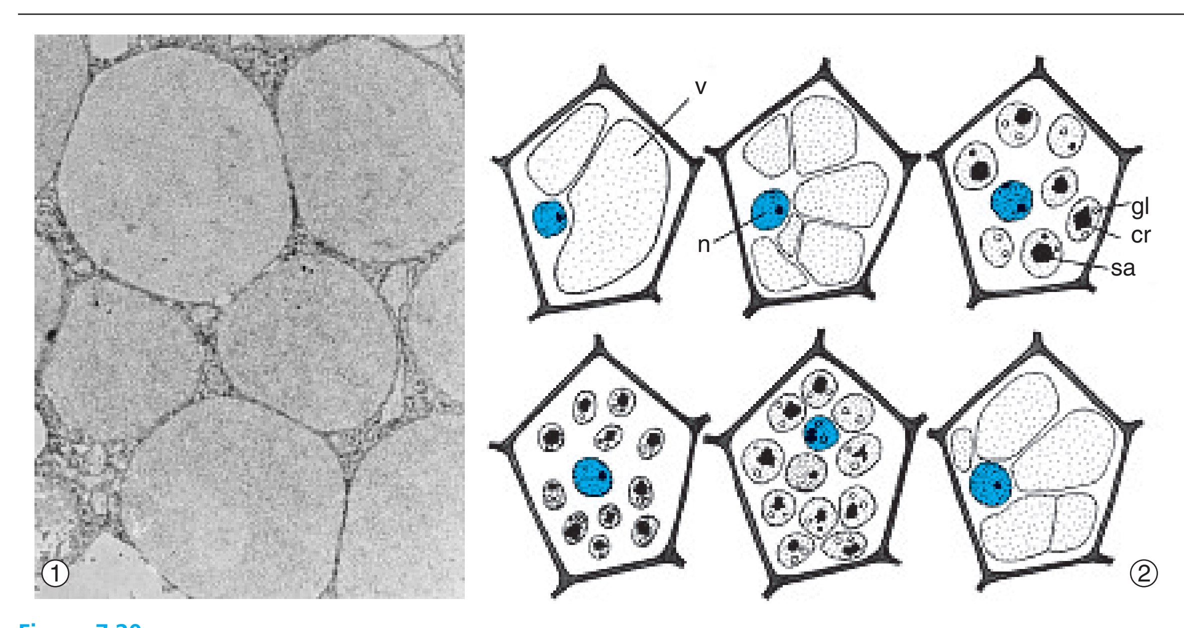


Figure 7.20

Grains d'aleurone et corps protéiques dans les cellules végétales

(1) Aspect des corps protéiques dans des cellules embryonnaires. **(2)** Cycle de formation et de disparition des grains d'aleurone dans une cellule de graine de ricin. (Cliché Labo BV, Orsay).
gl : globoïde ; cr : cristalloïde ; sa : substance amorphe ; n : noyau ; v : vacuole.

tiennent essentiellement à la famille, chimiquement très hétérogène, des **glycosides** (ou hétérosides) ; ils contiennent un sucre (qui favorise la solubilisation dans la vacuole) et un résidu non glucidique, appelé aglycone : alcool méthylique, glycérol, phénol, etc. L'aglycone contient parfois du S ou du N ; en fonction du sucre, on a des glucosides ou des galactosides. On peut citer : les composés cyanogéniques (formant du HCN), les pigments flavoniques (anthocyanes), les alcaloïdes, les tanins, etc. Les glycosides sont parfois toxiques pour les cellules elles-mêmes ; le stockage aurait donc ici une réelle fonction de séquestration et serait comparable au processus d'élimination des déchets chez les Animaux. En ce sens, les vacuoles, comme les lysosomes, représentent un compartiment potentiellement dangereux pour la cellule et dont le contrôle, au niveau de la perméabilité, est crucial.

Comme le stockage des glycosides ne correspond visiblement pas à un rôle de réserve métabolique, ni même à un rôle général d'excrétion, il a été suggéré que des fonctions plus subtiles, mais tout aussi importantes, soient associées à la présence des vacuoles qui les contiennent. Certains de ces composés interviennent sans doute dans les relations étroites existant entre les plantes et les Animaux, ou les plantes et leurs pathogènes. On attribue, par exemple, une fonction de signal attractif aux pigments floraux, vis-à-vis des Insectes pollinisateurs, ou bien de signal répulsif, dans le cas de molécules toxiques qui sont libérées des vacuoles, lorsque les plantes sont attaquées ou mangées par des prédateurs (cas des tanins ou des composés cyanogéniques). De nombreux exemples d'Insectes inféodés à des plantes particulières (piéride du chou) tendent à démontrer le caractère très spécifique de ces relations. À ce titre, les vacuoles pourraient finalement jouer un rôle considérable au niveau de l'équilibre et de l'évolution des populations végétales, comme moyen de sélection.

Enfin, un grand nombre de glycosides sont utilisés par l'Homme comme colorants, épices ou condiments, poisons, drogues, excitants, médicaments (nicotine, morphine, vinblastine, etc.) ; la pharmacopée comprend par exemple les dérivés de la digitaline, la phloridzine, la salicine, l'amygdaline, etc., qui sont des glycosides cardiaques. Les **huiles essentielles**, produits volatils et odorants, sont des mélanges complexes dans lesquels dominent des hydrocarbures terpéniques, avec des alcools ou des aldéhydes. Ce sont sans doute des déchets du métabolisme cellulaire ; on les trouve dans diverses glandes ou tissus spécialisés.

4.3. Mécanismes d'échange à travers le tonoplaste. Adressage des protéines vacuolaires

4.3.1. Les transporteurs vacuolaires

Il existe une grande diversité de transporteurs inclus dans le tonoplaste, permettant le passage actif ou passif des métabolites cités plus haut ; on y retrouve toutes les catégories de molécules porteuses présentées dans la membrane plasmique (voir chapitre 6). On connaît en particulier :

- deux **pompes à protons**, qui injectent ces derniers dans la vacuole et acidifient sa lumière (dont le pH peut descendre jusqu'à 4, soit une concentration en ions H^+ 10^3 fois supérieure à celle du hyaloplasme). Il existe une pompe ATP dépendante classique et une pompe originale, mue par l'hydrolyse du pyrophosphate ;
- de nombreux **transporteurs actifs secondaires**, en général de type antiport, qui utilisent le gradient de protons pour faire entrer des molécules simples dans la vacuole : glucose, fructose, acides aminés, etc. Dans le tonoplaste, ces transporteurs ont le même rôle que ceux décrits, par exemple, dans la membrane plasmique des cellules animales, et qui fonctionnent avec les ions Na^+ ;
- de nombreux **canaux ioniques** et **échangeurs ioniques**, qui assurent le passage des ions Ca^{2+}, Cl^- ou NO_3^-, par exemple ;
- un transporteur d'eau, de type **aquaporine**, conférant au tonoplaste une grande perméabilité à cette molécule, qui suit ainsi rapidement les mouvements des ions ;
- un **transporteur** spécifique **du saccharose**, qui couple le transport de ce composé à sa synthèse à partir de ses deux précurseurs, au sein d'un gros complexe enzymatique transmembranaire du tonoplaste.

L'ensemble de ces transporteurs est représenté dans la *figure* 7.21. Enfin, il a cytologiquement été démontré que le tonoplaste est capable d'une pinocytose active, au même titre que la membrane plasmique. Un phénomène de double pinocytose, ayant lieu simultanément au niveau des membranes plasmique et tonoplastique, pourrait être responsable du passage de composés extracellulaires, directement dans la vacuole (un peu à la manière de la transcytose des cellules animales).

4.3.2. Un exemple d'échange à travers le tonoplaste, en rapport avec un type particulier de photosynthèse

Certains échanges dans les deux sens ont lieu quotidiennement entre la vacuole et le hyaloplasme ; c'est le cas de l'acide malique, dans le cadre du métabolisme très particulier, nommé **CAM** (*crassulacean acid metabolism*). Cette périodicité est mise en évidence chez des plantes grasses (Crassulacées), adaptées aux régions arides, ou chez des plantes des milieux salés. Sans entrer dans le détail de ce métabolisme, on peut ainsi décrire les événements qui sont mis en jeu, au sein d'une même cellule, contrairement à ce qui se passe dans les **plantes** dites **en C4** (voir chapitre 10).

Pendant la nuit, qui est fraîche et relativement humide, les stomates des feuilles sont largement ouverts et le CO_2 atmosphérique emplit les tissus du végétal ; les cellules le fixent, en l'absence de lumière, selon le mode observé chez les plantes en C4, c'est-à-dire en produisant de l'acide malique, ou malate, au sein du hyaloplasme. Ce dernier est ensuite concentré dans la vacuole, grâce à un système de transport actif très efficace, consommant de l'ATP. Le phosphoénol-pyruvate, qui sert d'accepteur nocturne de CO_2, provient de l'hydrolyse et de la dégradation glycolytique d'une partie

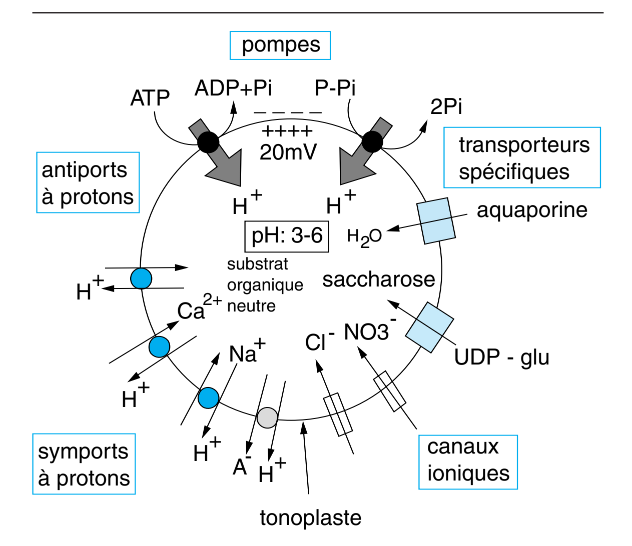


Figure 7.21

Transporteurs et canaux rencontrés dans les vacuoles des cellules des Végétaux supérieurs

Ce schéma récapitule les multiples modes de transport des ions et des molécules organiques dans la vacuole. Noter la présence d'une pompe protonique mue par le pyrophosphate (P-Pi).

de l'amidon qui a été stocké le jour précédent. Pendant la journée, qui est sèche, les stomates étant fermés pour des raisons d'économie d'eau, le CO_2 ne peut pénétrer dans la plante. Le malate accumulé dans la vacuole sort de celle-ci, et est décarboxylé dans le hyaloplasme. La teneur en CO_2 dissous augmente rapidement et la photosynthèse «normale» se met en route au sein des chloroplastes : l'ATP, le NADPH et l'amidon sont activement synthétisés ; ce dernier, qui est lui-même stocké dans le stroma, sera en partie dégradé la nuit suivante. Cette alternance physiologique jour/nuit consiste en fait en un stockage nocturne de CO_2, sous forme de malate, dans la vacuole ; les différences de concentration de ce métabolite vont de 1 à 100 entre le jour et la nuit.

4.3.3. Mécanismes d'accumulation spécifique de protéines dans les vacuoles

De même que pour les lysosomes, des mécanismes appropriés doivent diriger les protéines constitutives des vacuoles vers leurs destinations précises : membrane ou lumière, en particulier dans le cas des cellules qui y accumulent de grandes quantités de ces molécules (cas des graines protéagineuses). Le principe est identique à celui qui est connu pour les protéines du type «sécrété», dans les cellules animales : ces protéines possèdent un peptide-signal hydrophobe qui les dirige vers le réticulum endoplasmique rugueux, au niveau duquel a lieu l'essentiel de la synthèse, par insertion cotraductionnelle. Après transfert à l'appareil de Golgi et passage dans les divers saccules des dictyosomes, où ont lieu de nombreuses modifications post-traductionnelles, les protéines sont empaquetées dans des vésicules golgiennes spécifiques ; celles-ci sont finalement dirigées vers la vacuole avec laquelle elles fusionnent, et dans laquelle elles déversent leur contenu (pour les détails, voir chapitre 9). Certaines données suggèrent aussi que des vésicules provenant du réticulum endoplasmique rugueux pourraient directement rejoindre le tonoplaste.

4.4. Origine cellulaire des vacuoles

Des observations déjà anciennes, effectuées sur des cellules dont le contenu vacuolaire est naturellement pigmenté (ou artificiellement coloré avec du rouge neutre *in vivo*), ont montré que la ou les grosses vacuoles des cellules différenciées résultent, au cours de leur croissance, de l'accroissement progressif et de la fusion de minuscules vésicules plus ou moins filamenteuses. Le cytoplasme, dont la masse augmente peu, est repoussé contre la paroi, la majeure partie du volume cellulaire étant alors occupée par la vacuole. Il faut signaler ici que ce phénomène est réversible dans certains tissus, au sein desquels on assiste à une régression et une fragmentation des vacuoles, qui précèdent souvent une reprise des divisions cellulaires ; c'est le cas dans la **dédifférenciation**, qui a lieu au cours de l'embryogenèse somatique, par exemple (voir chapitre 14).

L'origine exacte de ces organites est longtemps restée objet de controverses, mais on s'accorde à reconnaître qu'elles dérivent, dans les cellules méristématiques, d'un réseau constitué de longs tubules de 0,1 µm de diamètre, ramifiés et anastomosés ; ce réseau, dit provacuolaire, est bien visible en microscopie à très haut voltage, après imprégnation osmique. Les tubules se fragmentent ensuite en vésicules isolées, disposées en chapelets, qui finissent par fusionner et donner naissance à des vésicules de plus en plus grosses.

Comme on l'a signalé plus haut, la membrane vacuolaire accroît sa surface grâce à un phénomène qui peut être comparé à l'exocytose, puisque des vésicules d'origine golgienne (et peut-être aussi issues du réticulum endoplasmique) viennent fusionner avec le tonoplaste. Ce processus est semblable à celui qui est responsable de l'augmentation de la surface de la membrane plasmique de toutes les cellules eucaryotiques, lors des phénomènes d'exocytose classique ; dans les deux cas, on parle de **membrane terminale**.

Perspective biomédicale

Les diabètes sucrés

Le diabète sucré rassemble différentes maladies dont le point commun est l'hyperglycémie. On en connaît deux grandes catégories : le diabète de type I, dit juvénile (10 à 20 % des cas), et le diabète de type II, qui apparaît tardivement (adultes et personnes âgées). On les qualifie respectivement, en fonction des causes de la maladie, de diabète insulinodépendant (DID) et de diabète non insulinodépendant (DNID). La gestion de la glycémie (maintenue entre 0,8 et 1,1 g/l de sang) est assurée essentiellement par deux hormones aux effets antagonistes : l'insuline et le glucagon (ainsi que l'adrénaline et les glucocorticoïdes), qui conditionnent à la fois l'entrée du glucose dans les cellules et l'orientation générale de leur métabolisme énergétique.

Le diabète de type I, qui est l'une des maladies chroniques les plus répandues chez l'enfant, a une origine auto-immune. Il résulte de la destruction progressive, par des lymphocytes T activés, des cellules béta des îlots de Langerhans du pancréas, qui sécrètent l'insuline (voir le chapitre 9). Le diabète de type II, souvent lié à l'obésité et plus insidieux, a des causes variées. Il est responsable de nombreux handicaps et d'une mortalité élevée (maladies coronariennes) dans les pays développés, en particulier. Les traitements sont évidemment différents : pour survivre, les patients affectés de DID sont tenus, quotidiennement, de subir des injections sous-cutanées d'insuline ; le DNID peut être traité par un régime approprié, l'exercice physique et divers médicaments.

Le rôle hypoglycémiant de l'insuline est dû au fait qu'elle favorise la pénétration du glucose sanguin dans les cellules musculaires striées et les cellules adipeuses, ainsi que son stockage sous forme de glycogène (dans le foie et le muscle). Au niveau des cellules cibles, l'insuline agit, via des récepteurs membranaires de type tyrosine kinases (voir le chapitre 13), en stimulant le recrutement et la mise en place de perméases du glucose dans la membrane plasmique (voir le chapitre 6). Ces transporteurs sont stockés au niveau de vésicules qui subissent une exocytose rapide après la transduction du signal envoyé par l'hormone. Au niveau métabolique, l'activité et la synthèse d'un certain nombre d'enzymes permettant l'utilisation du glucose par le foie (glycolyse, synthèse du glycogène) sont stimulées par l'insuline et inhibées par le glucagon. La régulation est inverse pour les enzymes permettant la production de glucose par le foie en période de jeûne.

L'insuline utilisée en thérapeutique a été initialement extraite de pancréas de porc ou de bœuf ; puis l'insuline porcine a été chimiquement «humanisée». Actuellement, l'insuline humaine est obtenue par génie génétique et fabriquée par des bactéries ; divers analogues de la molécule naturelle ont été obtenus par mutation, dont les actions sont soit ultrarapides, soit ralenties (de sorte qu'une seule injection par jour est désormais possible). Bien que non héréditaire, la susceptibilité au DID semble associée à la transmission de certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité.

Le diabète de type II est une maladie très hétérogène, caractérisée en général par un faible taux d'insuline (mais parfois normal) ; ses mécanismes physiopathologiques sont mal connus. Le problème provient en fait le plus souvent d'un dysfonctionnement des cellules cibles qui ne répondent plus normalement à l'hormone, en raison d'une diminution du nombre de ses récepteurs. La prise excessive et prolongée d'aliments, ou une intolérance périphérique au glucose, entraînent la sécrétion continue d'insuline, ce qui conduit à une insulinorésistance dont les mécanismes moléculaires exacts sont encore mal identifiés. Des altérations ont aussi été observées dans les mécanismes du transport du glucose et de son métabolisme. Enfin, de nombreux arguments suggèrent que des facteurs génétiques jouent un rôle important dans l'apparition de la maladie.

RÉSUMÉ

Afin d'assurer leur croissance et le renouvellement de leurs molécules, les cellules hétérotrophes ont en permanence besoin de nutriments, qui sont fournis par le milieu extérieur, et fabriqués par les organismes autotrophes. Les glucides sont, pour l'essentiel, dégradés par la glycolyse et le cycle des HMP. La glycolyse peut fonctionner en anaérobiose et est alors à la base des fermentations, qui produisent une faible quantité d'ATP ; en aérobiose, elle est une phase préparatoire à la respiration. Le cycle des HMP produit des coenzymes réduits destinés essentiellement à la synthèse des lipides.

Les voies de synthèse des nucléotides et des acides aminés, précurseurs des principales macromolécules de toutes les cellules, sont branchées sur celles du métabolisme énergétique ; chez les cellules eucaryotiques, celles-ci sont localisées à cheval sur le hyaloplasme, les mitochondries et les plastes. À l'inverse, ces molécules peuvent faire l'objet d'une dégradation partielle qui réinjecte leurs chaînons carbonés de base dans les processus du catabolisme (gluconéogenèse) ; ceci témoigne d'une profonde imbrication des processus de dégradation et de synthèse au sein des cellules.

La constitution de réserves organiques ou minérales est un trait commun à tous les êtres vivants ; après leur dégradation, elles permettent aux cellules de survivre dans des conditions de pénurie alimentaire. Un grand nombre de macromolécules et de structures de stockage, spécialisées ou non, sont décrites chez les Procaryotes et les Eucaryotes. Ces composés représentent une source rapidement mobilisable de carbone et d'énergie, de précurseurs et de sels minéraux. Leur synthèse et leur dégradation impliquent en général des voies biochimiques différentes, ce qui permet un contrôle séparé des étapes clefs de ces métabolismes.

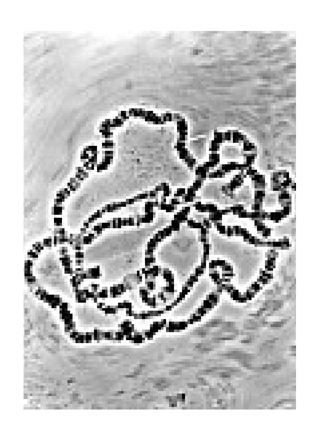
Chez les Eucaryotes, deux types d'organites sont directement impliqués dans les processus de stockage et de digestion de composés d'origine endogène ou exogène. Les lysosomes des cellules animales, des Protistes et des Champignons, constituent un compartiment original, en raison de la nature des enzymes qu'ils contiennent ; ils sont spécialisés dans les fonctions de digestion et impliqués à ce titre dans une multitude d'activités physiologiques. L'hétérophagie, qui consiste dans la digestion de matériel d'origine extracellulaire (particules ou cellules) intervient surtout dans la nutrition, mais aussi dans les phénomènes de défense des organismes pluricellulaires. L'autophagie consiste dans la digestion contrôlée de matériel interne aux cellules elles-mêmes, et est impliquée dans le renouvellement permanent des structures biologiques ; elle est mise en jeu lors de divers phénomènes d'histolyse observés chez les organismes pluricellulaires. Pour ces raisons, de nombreuses maladies sont associées à un mauvais fonctionnement des lysosomes.

Chez les Végétaux, les vacuoles ont, outre diverses fonctions capitales spécifiques à ce règne, un rôle primordial dans le stockage à court ou long terme d'une grande quantité d'ions et de métabolites, soit à l'état soluble, soit sous forme de macromolécules. Leur origine cellulaire et leurs propriétés biochimiques les rapprochent des lysosomes des cellules animales ; la richesse du tonoplaste en transporteurs témoigne de l'importance des échanges qui existent entre la vacuole et le hyaloplasme.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Qu'appelle-t-on phosphorylation au niveau du substrat ? dans quelle voie métabolique rencontre-t-on ce phénomène qui est à l'origine d'une partie de l'ATP, dans la majorité des êtres vivants ?
2. Pourquoi peut-on distinguer deux phases fondamentalement différentes dans la série des étapes de la glycolyse ? Quelle est la réaction chimique qui les sépare ?
3. Quelle est la signification physiologique des différents types de fermentations décrits chez les Procaryotes ou les Eucaryotes ?
4. Quels composés importants du métabolisme des macromolécules sont fabriqués dans la voie des pentoses-phosphates ?
5. Quelle est la destination métabolique majeure du NADPH fourni par la voie des HMP ?
6. Dans quels compartiments cellulaires se déroulent la glycolyse et la voie des pentoses-phosphates ?
7. Qu'appelle-t-on gluconéogenèse ? quelle est la localisation de ses principales étapes au sein des cellules eucaryotiques ?
8. Donner le nom des différents composés stockés à titre de réserve au sein du hyaloplasme des cellules procaryotiques et eucaryotiques. Sous quelle forme les y trouve-t-on ?
9. Nommer les principales structures de réserve spécialisées décrites chez les Eucaryotes. Quelle forme de stockage représentent-elles ?
10. Rappeler les principales étapes biochimiques intervenant dans la synthèse des glucides de réserve.
11. Quelles caractéristiques du glycogène font de ce composé une molécule de réserve du glucose particulièrement intéressante pour l'organisme ?
12. En quoi la découverte des lysosomes est-elle originale dans l'histoire de la biologie cellulaire ?
13. Quelles propriétés biochimiques permettent de caractériser les lysosomes des cellules animales ? Donner le principe d'une méthode cytologique permettant d'identifier avec certitude une vésicule lysosomale.
14. Dans quelle glande endocrine des Vertébrés les lysosomes ont-ils un rôle capital à jouer pour la synthèse de l'hormone sécrétée ? Rappeler brièvement les étapes mises en jeu.
15. Donner la définition de l'hétérophagie et citer quelques exemples classiques de ce phénomène.
16. Même question pour l'autophagie.
17. Chez quels organismes la digestion extracellulaire, liée à l'exocytose d'enzymes lysosomales, est-elle très importante d'un point de vue nutritionnel ?
18. Nommer et donner les causes de diverses maladies, génétiques ou non, liées au dysfonctionnement des lysosomes.
19. Rappeler les principales fonctions physiologiques associées aux vacuoles chez les Végétaux supérieurs.
20. Quels sont les principaux métabolites stockés dans les vacuoles ? quelle est leur origine physiologique au sein de la cellule végétale ?
21. Donner le nom et la nature chimique de diverses macromolécules pouvant être emmagasinées pour de longues durées au sein des vacuoles.
22. Quelles sont les fonctions des nombreux transporteurs associés à la membrane des vacuoles des cellules végétales ?
23. Quelle est la particularité du métabolisme de l'acide malique chez les plantes dites CAM ?



Chapitre 8

EXPRESSION DES GÈNES NUCLÉAIRES CHEZ LES EUCARYOTES
Aspects cellulaires et moléculaires

La quasi-totalité de l'ADN des cellules eucaryotiques est contenue dans le noyau et, contrairement à ce qui se passe pour les Bactéries, l'essentiel de l'information génétique est enfermé dans un compartiment membranaire spécifique. Une autre différence fondamentale tient à la manière dont l'ADN, qui se présente chez les Eucaryotes sous la forme de longues molécules linéaires, est stocké dans cet organite. Une catégorie de protéines propres à ce groupe d'êtres vivants, les histones, est à la base de la constitution de la chromatine, élément structural majeur du noyau.

Depuis un siècle, le rôle du noyau a été successivement analysé au moyen d'expériences de type cellulaire, biochimique et physiologique, dont nous décrirons les plus marquantes dans ce chapitre. Deux exemples de chromosomes remarquables, dits chromosomes géants, seront aussi étudiés en détail car ils ont permis de mieux comprendre les mécanismes de l'expression des gènes et le fonctionnement normal du noyau. Toutes ces analyses démontrent que la compartimentation nucléaire entraîne la séparation dans l'espace et par conséquent, dans le temps, de la transcription et de la traduction. Ceci a des conséquences importantes : les ARN codant les protéines, en particulier, ne sont pas immédiatement utilisés pour fabriquer celles-ci, mais sont recouverts de protéines dont certaines induisent sur eux de profonds remaniements moléculaires. Les mécanismes assurant le flux de l'information génétique sont ainsi beaucoup plus complexes chez les Eucaryotes que chez les Procaryotes. De ce point de vue, le mode de fonctionnement du nucléole constitue un exemple très intéressant de rapport entre structure et fonction, au niveau du matériel génétique.

La connaissance des mécanismes de régulation coordonnée de l'activité des gènes devrait fournir la clef du problème fondamental posé par le développement embryonnaire des organismes pluricellulaires. Alors que toutes les cellules d'un embryon animal, par exemple, héritent de la même information génétique, certaines sont amenées à se différencier en types bien distincts. Leur spécialisation progressive est essentiellement due à la production de collections spécifiques de protéines ; celle-ci est expliquée par des phénomènes d'activation ou de répression de gènes, de sorte que ces cellules n'utilisent en fait qu'une faible partie de leur patrimoine génétique. Enfin, comme chez tous les êtres vivants, l'expression des gènes fait l'objet de contrôles rapides et à court terme, qui permettent une adaptation des organismes eucaryotiques aux changements de l'environnement.

1. ORGANISATION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE CHEZ LES EUCARYOTES

1.1. Organisation du noyau interphasique

1.1.1. Aspect du noyau en microscopie photonique

Le noyau apparaît, en lumière naturelle, comme un globule très réfringent ; on rappelle que c'est le premier organite cellulaire à avoir été identifié.

De grande taille : 5 à 20 µm de diamètre, il est aisément colorable par les techniques de l'histologie classique (voir chapitre 2). De forme le plus souvent sphérique ou lenticulaire, il présente parfois un aspect plurilobé (dans des globules blancs dits, à tort, polynucléaires) ; il peut aussi prendre une forme très allongée dans certaines cellules spécialisées telles que les spermatozoïdes ou les cellules musculaires lisses. Le volume du noyau est en général proportionnel à celui de la cellule (10 % en moyenne) ; chez un organisme donné, cependant, sa taille relative (**rapport nucléocytoplasmique**) est un indice de l'activité physiologique de la cellule. Ce rapport est d'autant plus élevé que l'activité cellulaire est importante ; les cellules embryonnaires ou méristématiques, par exemple, ont un noyau volumineux et sont caractérisées par un rapport nucléocytoplasmique élevé.

1.1.2. Structure et ultrastructure nucléaires

Après une coloration appropriée (à l'hématoxyline, qui est un colorant basique, par exemple), le noyau présente une structure complexe. Il apparaît limité par un système membranaire en apparence simple : la «**membrane nucléaire**». Son contenu montre un réseau intensément colorable, d'aspect réticulé ou granuleux, nommé **chromatine** (substance «prenant les colorants») ; celle-ci baigne dans un liquide incolore : le **suc nucléaire** ou **nucléoplasme**. Enfin, on observe un ou plusieurs globules de 1 à 3 µm de diamètre, colorables par des techniques différentes de celles colorant la chromatine : les **nucléoles** (voir *figures* 2.7 et 2.8).

• En microscopie électronique, la frontière nucléaire apparaît en fait constituée de deux membranes classiques épaisses de 6 nm environ ; l'espace intermembranaire est large de 20 à 50 nm (voir *figure* 8.1). On doit donc parler d'**enveloppe nucléaire** ; celle-ci est percée de pores qui font communiquer le nucléoplasme et le hyaloplasme. La membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux (voir chapitre 9), et porte parfois des ribosomes sur sa face externe. La membrane interne est doublée à l'intérieur, du côté du nucléoplasme, par une structure plus ou moins épaisse (de 15 à 50 nm) appelée **lamina**. Cette doublure, étroitement accolée à la membrane, est constituée de protéines appelées **lamines**, appartenant à la famille des filaments intermédiaires (voir chapitre 11). Celles-ci sont organisées en un complexe fibreux à maille carrée qui contribue à rigidifier l'enveloppe nucléaire et lui confère sa résistance vis-à-vis de certains détergents doux.

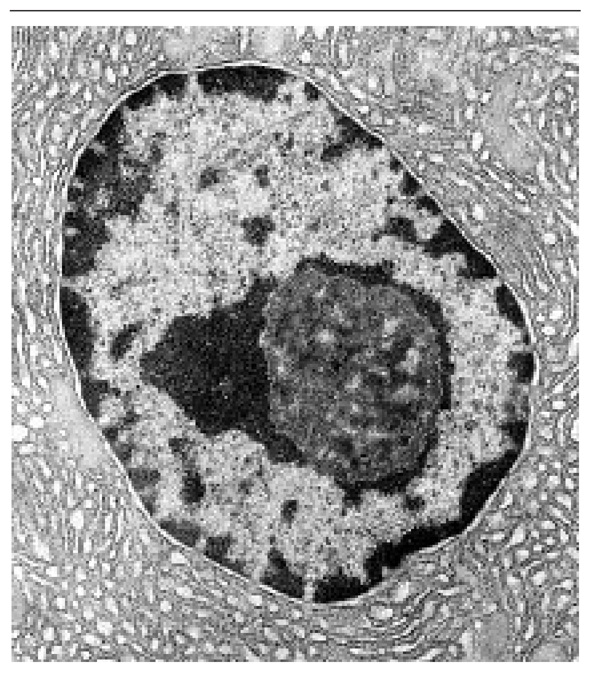


Figure 8.1

Noyau interphasique observé en microscopie électronique

On distingue : 1) l'enveloppe nucléaire, contre laquelle sont appliqués des amas sombres de chromatine dense (hétérochromatine) ; 2) la chromatine diffuse (euchromatine), plus claire ; 3) un gros nucléole central, auquel est associé un amas de chromatine dense.
Cellule pancréatique exocrine de souris. Grossissement × 12 000. (Cliché J. André, Labo BC4, Orsay).

• Les **pores nucléaires** ont un diamètre voisin de 100 nm ; il en existe 3 à 4 000 par noyau de cellule de Mammifère typique (voir *figure* 8.2). Ce ne sont pas de simples orifices ménagés dans l'enveloppe, mais au contraire des structures complexes constituées de 150 à 200 polypeptides et formant une structure dont la forme est celle d'une «roue de charrette» ; on parle de **complexes des pores**. Ces derniers sont étroitement associés à la lamina (voir *figure* 8.3). Ils se comportent comme des canaux aqueux permettant la diffusion plus ou moins rapide de molécules dont la masse moléculaire peut aller jusqu'à 70 kDa ; leur diamètre efficace serait donc d'environ 9 nm. La question est de savoir comment des particules ou des complexes enzymatiques de diamètre et de taille supérieurs peuvent franchir ces pores. On a démontré qu'il existe en fait un transport actif nécessitant une

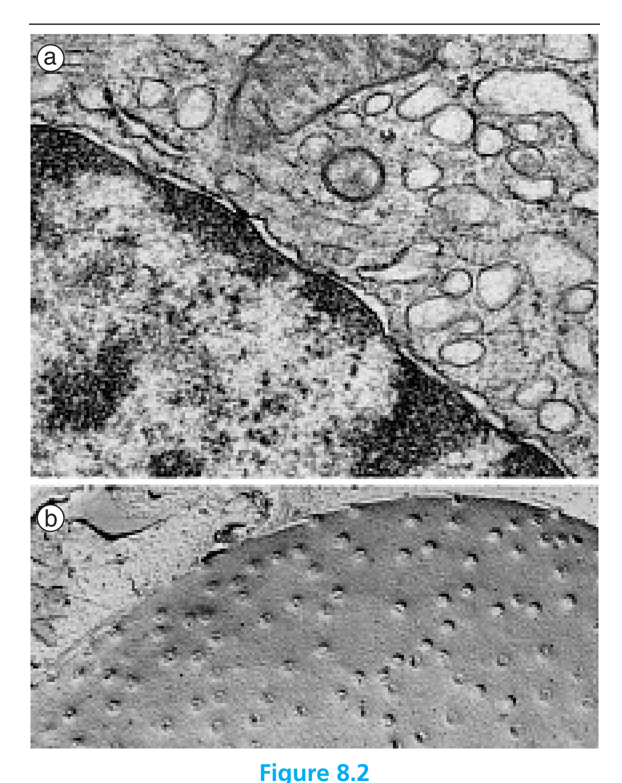


Figure 8.2

Aspect de l'enveloppe nucléaire en microscopie électronique

(a) Coupe ultrafine : on distingue nettement les deux membranes, l'espace intermembranaire et les emplacements des complexes des pores, marqués par l'absence de chromatine dense appliquée contre l'enveloppe ; la lamina n'est pas observable sur ce cliché. **(b)** Aspect en cryofracture : la surface représentée est la face supérieure de la membrane interne, la fracture étant passée dans l'espace intermembranaire ; la distribution des pores est bien visible sur ce cliché.
Cellule d'épididyme de souris. Grossissement × 30 000. (Cliché J. André, Labo BC4, Orsay).

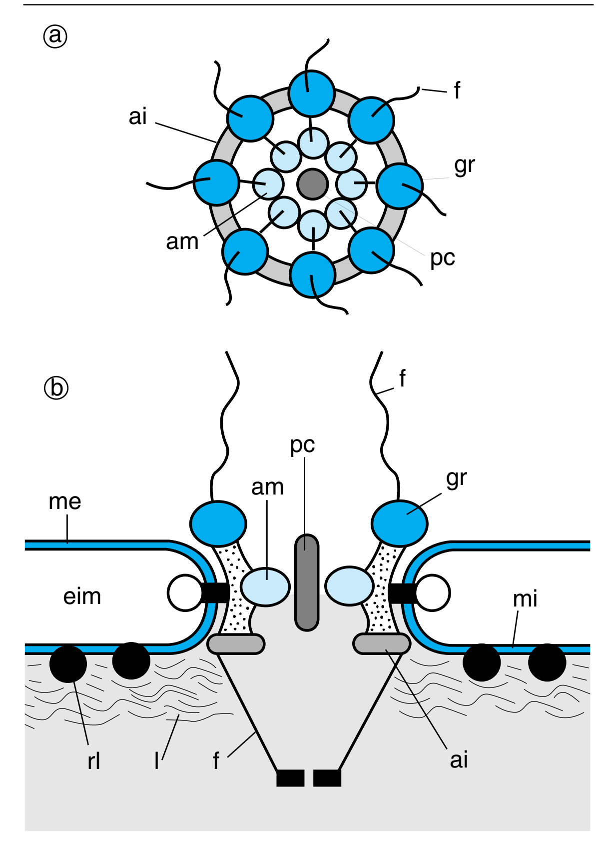


Figure 8.3

Représentation schématique des complexes des pores

(a) Vue de dessus, côté hyaloplasmique : on distingue la structure à base octogonale. **(b)** Vue en coupe, montrant l'enveloppe nucléaire et la lamina (l). Les pores nucléaires sont constitués d'un anneau hyaloplasmique formé de 8 granules (gr) de 20 nm de diamètre, associé à 2 autres anneaux plus fins (am, ai), situés autour du canal du pore. Des structures fibreuses (f) partent de ces anneaux et sont dirigées vers le hyaloplasme ou le nucléoplasme ; dans ce dernier, les fibres se réunissent pour constituer une sorte de panier ouvert, ou de cage. Le centre du canal est occupé par une particule de grande taille (pc) représentant l'axe de l'édifice.
me et mi : membranes externe et interne ; eim : espace intermembranaire ; am et ai : anneaux médian et interne ; pc : particule centrale ; rl : récepteur de la lamine.

déformation soit des particules transportées, soit de la structure interne des pores (voir chapitre 9).

• La chromatine, dont la composition chimique et la structure précise seront examinées plus loin, est constituée de deux catégories bien distinctes de matériel : 1) l'**hétérochromatine** (chromatine dense), très opaque aux électrons, et 2) l'**euchromatine** (chromatine diffuse, invisible en microscopie photonique), constituée de fines fibres de 10 à 30 nm de diamètre, associées à l'hétérochromatine (voir *figure* 8.1).

• Le nucléole apparaît comme une masse spongieuse, de structure hétérogène, dans laquelle on distingue trois régions dont la composition a été connue grâce aux techniques cytochimiques (voir *figures* 8.1 et 8.4) :

– un **centre fibrillaire** (d'importance variable et toujours modeste), formé de fibres lâches de chromatine diffuse ; cette zone n'est pas toujours facile à identifier ;

– un **composant fibrillaire dense**, contenant de l'ADN et une importante quantité d'ARN ; il se présente souvent sous la forme d'un ruban pelotonné ;

– un **composant granulaire**, constitué de particules de 15 à 25 nm de diamètre, riches en ARN et en protéines, dont l'aspect rappelle celui des ribosomes. Des amas de chromatine dense sont parfois accolés à la périphérie du nucléole.

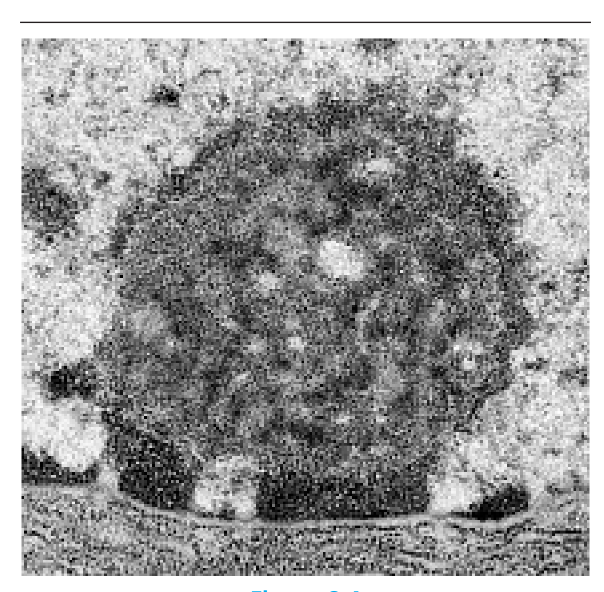


Figure 8.4

Ultrastructure du nucléole

La structure hétérogène et «spongieuse» apparaît ici clairement. On distingue le composant fibrillaire, sous l'aspect d'un ruban tortueux, le composant granulaire et plusieurs zones claires. Ce nucléole est entouré de chromatine dense et accroché à l'enveloppe par un amas de celle-ci.
Cellule pancréatique de souris. Grossissement × 30 000. (Cliché J. André, Labo BC4, Orsay).

Le détail du fonctionnement moléculaire du nucléole sera donné plus loin. On sait depuis longtemps que cette structure est liée à un site chromosomique précis. En effet, au moment de la mitose, on la voit disparaître à mesure que les chromosomes s'individualisent, et réapparaître au début de l'interphase. Comme on le verra plus loin, les nucléoles sont le produit de l'activité de ces sites, qui correspondent à ce que les cytologistes appellent les **constrictions secondaires**, dans les chromosomes métaphasiques (voir chapitre 12).

1.1.3. Diversité des situations cellulaires

La plupart des cellules animales ont un seul noyau, mais il existe des exceptions : les cellules hépatiques des Mammifères, par exemple, en comptent souvent deux ; les cellules musculaires striées et les ostéoclastes sont des cellules géantes contenant un grand nombre de noyaux. Les **syncytiums** sont des masses cytoplasmiques volumineuses au sein desquelles on peut observer un grand nombre de noyaux (voir chapitre 2). À l'inverse, certains types cellulaires perdent leur noyau au cours de leur différenciation et sont, à court terme, voués à la mort : c'est le cas des hématies des Mammifères ou des cellules des tubes criblés (phloème) des Végétaux supérieurs.

1.2. Composition chimique et organisation de la chromatine

1.2.1. Composition chimique globale des noyaux

Les techniques cytochimiques, telles que la réaction de Feulgen (voir encart suivant), montrent que la chromatine contient de l'ADN, alors que les nucléoles contiennent essentiellement des ARN.

La composition chimique des noyaux est connue depuis longtemps, car ce sont les organites les plus faciles à purifier par les techniques du fractionnement cellulaire. À côté de l'ADN, les protéines sont le constituant majeur de la chromatine. On distingue deux familles principales : les **histones**, et les **protéines** dites **non histones**, qui se lient toutes deux à l'ADN, mais se distinguent par de nombreuses propriétés. Les histones appartiennent à cinq types moléculaires différents et sont très abondantes, tandis que les «non histones» sont extrêmement diverses et individuellement peu représentées (10^3 à 10^4 fois moins que chaque histone). Ces proportions s'expliquent par le fait que les premières interviennent dans l'empaquetage et la compaction de l'ADN au sein du noyau, tandis que les secondes jouent un rôle dans l'expression des gènes et leur contrôle, et dans la réplication. Enfin, une faible quantité d'ARN est toujours associée à la chromatine.

Dans la chromatine, l'ADN est représenté par de très longues molécules, dont il existe un exemplaire pour chaque chromosome contenu dans le noyau. Ceci a été prouvé pour des organismes à petit génome, comme la drosophile ou la levure (qui possède un nombre réduit de petits chromosomes : 16 ; voir *figure* 3.5), et est sans doute vrai pour tous les Eucaryotes. Chez l'Homme, les plus longues d'entre elles atteignent près de 9 cm de long, et chez d'autres espèces, en particulier certains Amphibiens, dont le génome est 30 fois plus grand, elles sont encore plus longues.

Encart technique

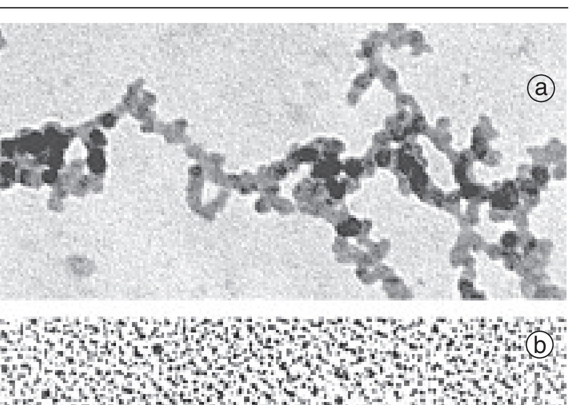
La réaction « nucléale » de Feulgen

Cette réaction met spécifiquement en évidence l'ADN. Son principe est le suivant : les coupes histologiques sont soumises à une hydrolyse acide ménagée (HCl 5N, 20 °C, 15 min). Ce prétraitement élimine uniquement les bases puriques de l'ADN et libère les fonctions aldéhydiques réductrices au niveau du C1 du désoxyribose. Si cette hydrolyse se prolonge trop longtemps, tout l'ADN est dégradé, solubilisé et n'est plus maintenu dans des structures cytologiquement identifiables. C'est d'ailleurs ce qui se passe pour l'ARN cellulaire, qui est perdu au cours de ce protocole, et donc non observable. Les fonctions aldéhydiques démasquées sont repérées grâce au réactif de Schiff qui se recolore en rose à leur niveau (voir la réaction à l'APS, chapitre 7) ; toute structure riche en ADN apparaît alors de cette couleur au microscope. C'est ainsi que l'on colore la chromatine et les chromosomes des cellules eucaryotiques. Cette coloration est quantitative et permet de comparer les teneurs en ADN dans les noyaux de cellules d'organismes différents ou dans différentes cellules d'un même organisme. Cette technique nécessite les mêmes contrôles que ceux décrits pour la réaction à l'APS ; elle est actuellement abandonnée pour des méthodes moins spécifiques, mais plus faciles à mettre en œuvre (voir chapitre 3).

1.2.2. Histones et nucléosomes

Les cinq types différents d'histones ont en commun les propriétés suivantes : 1) petite masse moléculaire (MM de 11 à 24 kDa), 2) grande richesse en acides aminés basiques (lysine et arginine : 20 à 30 %) chargés positivement, et 3) grande conservation évolutive (sauf pour H_1). Ces molécules sont présentes en quantités à peu près équimolaires, et se répartissent en deux familles : H_2A, H_2B, H_3, H_4 (102-135 acides aminés) et H_1 (210-220 acides aminés) ; les premières sont dites « nucléosomiques », la dernière est dite « internucléosomique ». Contrairement aux quatre autres histones, il existe plusieurs variétés d'histone H_1 chez un organisme donné ; on en connaît six différentes, par exemple, dans les cellules de Mammifères.

La manière dont ces protéines sont associées à l'ADN a été étudiée grâce à la microscopie électronique ; l'étalement de la chromatine, associé à l'ombrage métallique (voir chapitre 3), permet d'observer une structure remarquable, vue pour la première fois en 1974, et se présentant sous l'aspect d'un collier de perles (voir *figure* 8.5). La chromatine décondensée au maximum se présente sous forme de billes de 10 nm de diamètre environ, séparées par un fin filament de 2,5 nm d'épais-





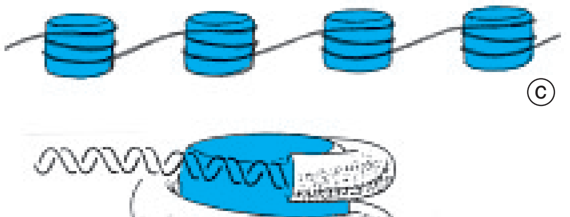


Figure 8.5

Organisation de la chromatine nucléaire

(a) Chromatine partiellement désorganisée, obtenue après lyse ménagée des noyaux. **(b)** Structure caractéristique en collier de perles, montrant les nucléosomes. **(c)** Représentation schématique de quelques nucléosomes formant le nucléofilament. **(d)** Organisation d'un nucléosome, montrant le trajet de l'ADN formant deux tours (146 paires de bases) autour d'un cœur protéique. Par digestion ménagée, grâce à une ADNase, on démontre que le fil du « collier de perles » est constitué d'ADN nu, alors que les billes contiennent de l'ADN et des histones. Le cœur protéique (en couleur) est constitué de 2 exemplaires de chacune des 4 histones nucléosomiques : H_2A, H_2B, H_3 et H_4. (Clichés Labo BC4, Orsay).

seur : ce sont les **nucléosomes**. On appelle **nucléofilament** cette fibre élémentaire constituant la chromatine.

L'interaction entre ADN et histones est peu spécifique ; elle s'établit entre les charges négatives portées par le squelette sucre-phosphate de chaque brin de la double hélice et les charges positives des acides aminés de ces protéines. Deux nucléosomes sont séparés par une longueur moyenne d'environ 60 paires de bases d'ADN nu (lien internucléosomique). L'ADN subit de cette façon une première condensation (146 paires de bases = 49,6 nm de long, comparés à 10 nm) ; cette structure constitue, à la manière d'une bobine de fil, le premier niveau d'empaquetage de l'ADN. Il faut se souvenir que dans un noyau somatique humain de 5-10 µm de diamètre, il faut faire entrer 1,8 mètre d'ADN, ce qui représente environ 3.10^7 nucléosomes.

1.2.3. La fibre nucléosomique et les édifices d'ordre supérieur

L'étalement de chromatine native ou les coupes ultrafines montrent le plus souvent une fibre compacte de 30 nm de diamètre. Cette structure d'ordre supérieur au collier de perles résulte de l'empilement des nucléosomes, qui s'organisent en une hélice régulière (voir *figure* 8.6). Le rôle des histones internucléosomiques consiste à ponter les perles les unes aux autres en s'accrochant à elles d'une part, et entre elles d'autre part. Le détail des interrelations est mal connu, mais on sait cependant que ces histones H_1, qui ont une région centrale globuleuse, encadrée des bras N et C terminaux, se fixent sur le bord externe de l'ADN entourant l'octamère. Ce type de structure permet de faire passer de 5 cm d'ADN nu à 0,1 cm.

Ces deux premiers niveaux d'organisation ne suffisent pas à rendre compte de la compacité structurale observée dans l'hétérochromatine ou dans les chromosomes métaphasiques. On suppose que des mécanismes voisins, à savoir un système de boucles et d'hélices d'ordre supérieur, entrent en jeu pour condenser cette fibre dans ces deux situations (voir chapitre 12). Ces boucles auraient une longueur de 20 à 150 kilopaires de bases d'ADN et seraient pontées à leur base par des protéines de liaison, organisant ainsi une sorte de squelette axial. Cette organisation est suggérée par l'observation de boucles de ce type dans les chromosomes géants en écouvillon ou polyténiques (voir plus loin), ainsi que chez les Procaryotes. Un chromosome humain moyen, représentant une longueur de 4,5 cm d'ADN environ, contiendrait 1 000 à 3 000 boucles ; leur nombre, par génome haploïde, serait donc du même ordre de grandeur que le nombre de gènes estimé pour l'espèce, soit 30 à 40 000 gènes.

Les boucles des différents chromosomes localement déroulés sont enchevêtrées et non observables de façon individuelle dans la chromatine interphasique ; cependant des données récentes suggèrent que celle-ci est hautement structurée et que chaque chromosome se mélange peu avec ses voisins. Il faut enfin avoir une vision dynamique de la chromatine car, à un moment donné, certains domaines des chromosomes peuvent être dans un état hypercondensé et, plus tard, être déroulés et actifs. La chromatine doit être vue comme une succession de domaines condensés et de domaines plus diffus, avec des passages réversibles d'un état dans l'autre, suivant la phase du cycle cellulaire, la présence de stimuli extérieurs… Nous verrons plus loin, en effet, que la synthèse des ARN a essentiellement lieu dans l'euchromatine.

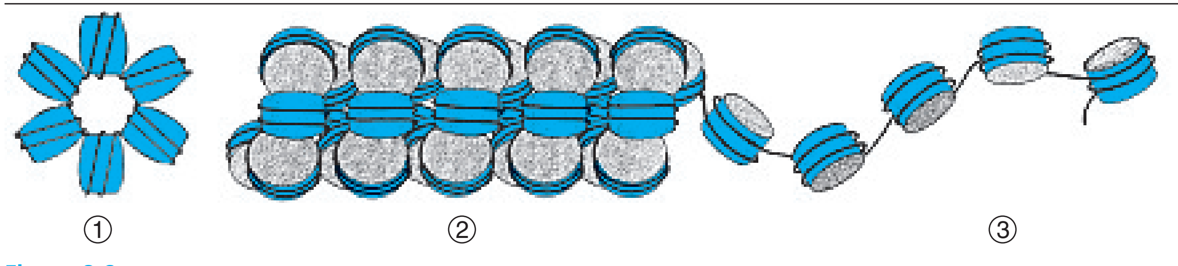


Figure 8.6

Organisation de la fibre de chromatine de 30 nm de diamètre

Elle est constituée d'un solénoïde dans lequel 6 nucléosomes forment un tour complet. L'histone H_1, qui stabilise cet édifice compact, n'est pas figurée sur ce schéma. **(1)** Vue de dessus ; **(2)** fibre compacte de 30 nm ; **(3)** fibre en «collier de perles», résultant du déroulement de la précédente.

2. RÔLE DU NOYAU DANS LA VIE CELLULAIRE

L'expression **noyau quiescent** parfois appliquée à l'état apparent du noyau, par opposition à son aspect lors de la division, n'implique pas qu'il n'ait aucune activité biochimique. Bien au contraire, cette activité est maximale pendant la période séparant deux divisions successives, appelée **interphase** ; simplement, cette intense activité ne s'accompagne pas de changements morphologiques ou structuraux bien visibles. Des expériences déjà anciennes de physiologie cellulaire, dont les premières ont débuté il y a un siècle environ, ont cherché à identifier les fonctions de cet organite dans la vie cellulaire. Conduites en parallèle avec celles relatives à la nature chimique de l'information génétique (voir chapitre 4), elles ont grandement contribué à établir les modalités du fonctionnement de cette dernière.

2.1. Organisation du noyau et activité cellulaire

Bien que l'aspect du noyau soit peu modifié au cours de l'interphase, on observe cependant certaines corrélations globales entre morphologie et fonction, lors des processus de différenciation cellulaire. De manière constante, la microscopie électronique montre que les cellules embryonnaires, animales ou végétales, possèdent une abondante chromatine diffuse et peu, ou pas, de chromatine condensée. Très rapidement, au cours du développement des tissus, les noyaux acquièrent de plus en plus de chromatine condensée. Chez l'adulte, on observe une évolution semblable lors du processus de différenciation concernant certaines lignées cellulaires (comme celle conduisant aux globules rouges) : lorsqu'on passe des cellules-souches, peu différenciées, en division active, à celles engagées dans une spécialisation fonctionnelle très pointue, on note que l'hétérochromatine envahit progressivement le noyau.

Une autre modification spectaculaire du noyau concerne la morphologie et l'organisation des nucléoles. Il est bien établi que leur taille globale est corrélée à l'activité cellulaire, et proportionnelle à celle-ci. Chez des cellules végétales à l'état de dormance, par exemple, ils sont pratiquement inexistants, alors que dans des cellules fabriquant des quantités très importantes de protéines, ils occupent jusqu'à 25 % du volume du noyau ! Par ailleurs, l'étude du rapport entre les volumes du composant granulaire et du composant fibrillaire montre que les cellules actives en synthèse protéique possèdent des nucléoles ayant un composant granulaire très développé ; la signification de cette observation sera donnée plus loin.

On peut faire une dernière remarque, au sujet des pores nucléaires : dans les types cellulaires connus pour présenter un trafic moléculaire important entre le nucléoplasme et le hyaloplasme, la densité des pores dans l'enveloppe nucléaire est telle qu'ils représentent 25 % de sa surface ! C'est le cas par exemple pour l'ovocyte d'Amphibien en phase de vitellogenèse, chez lequel on compte jusqu'à 60 complexes par μm^2. En revanche, dans les noyaux des cellules différenciées, riches en hétérochromatine, le nombre de pores est très réduit (2 par μm^2), et leur emplacement est rendu visible par la présence d'espaces clairs entre les paquets denses d'hétérochromatine.

2.2. Expériences de mérotomie, d'énucléation et de greffe nucléaire

La **mérotomie** consiste à sectionner des cellules en fragments, dont un seul conserve le noyau ; en raison de leur taille parfois importante, les premiers types cellulaires ainsi analysés furent des Protistes. Les infusoires Ciliés et les Amibes ont été étudiés dès 1880 par Balbiani et ses contemporains. Une expérience effectuée sur le stentor mérite d'être décrite : ce Protozoaire possède un macronucléus organisé en chaînette le long du corps cellulaire et un micronucléus situé dans la zone supérieure (voir *figure* 2.11). Des sections transversales de la cellule (admirons la prouesse technique !) conduisent à des fragments possédant, soit un morceau de noyau, soit pas de noyau du tout. Ceux qui contiennent un bout de macronucléus cicatrisent aisément puis régénèrent en quelques jours une cellule complète après une croissance importante et une morphogenèse bien précise. Les fragments anucléés cicatrisent mais ne s'accroissent pas (absence d'assimilation), et finissent par mourir et se lyser au bout de 1 à 2 semaines. Des résultats comparables ont été obtenus chez les Amibes.

Les conclusions de ces expériences simples sont très éclairantes : elles démontrent que le noyau contrôle la croissance cellulaire à travers l'assimilation, mais qu'il détermine aussi la morphogenèse, c'est-à-dire la réalisation de structures morpholo-

giques souvent complexes. Elles indiquent aussi que certains processus vitaux peuvent se poursuivre quelque temps dans le cytoplasme sans sa présence, et que l'information qui en est issue peut être véhiculée sur une assez longue distance.

Des opérations plus fines d'**énucléation** et de **greffe nucléaire** ont été possibles dès le développement de la microchirurgie, grâce aux micromanipulateurs mis au point en particulier par Comandon et de Fonbrune (1939). Il a été possible à ces auteurs d'enlever le noyau d'une Amibe (et de vérifier les anciennes données sur la mérotomie) et de compléter ces expériences au moyen de la contre-épreuve suivante : ils ont réussi à transplanter un nouveau noyau, tiré d'une autre Amibe, à une Amibe récemment énucléée. Dans les 2 à 4 minutes qui suivent la greffe, on observe que la cellule à nouveau entière retrouve la possibilité de se mouvoir, de prélever des proies par phagocytose et les digérer, et même de se diviser.

De très nombreuses expériences de greffe nucléaire ont été réalisées sur une algue unicellulaire marine géante, nommée *Acetabularia*, dans les années 1930 (Hämmerling).

Nous verrons plus loin que les intuitions de Hämmerling étaient fondées car il fut démontré en 1951, dans ce système biologique, que les substances qu'il avait imaginées étaient des ARN (rappelons que la structure de l'ADN ne fut découverte qu'en 1953 !). La notion d'interactions nucléocytoplasmiques est fondamentale en biologie cellulaire : le devenir des cellules est à tout instant contrôlé grâce à des mécanismes de régulation par rétroaction, semblables dans leur principe à ce qui est connu dans le métabolisme. La différence fondamentale est qu'il s'agit ici de contrôler l'expression des gènes, le plus souvent grâce au produit d'autres gènes, à savoir des protéines ayant une fonction d'activation ou de répression du génome. Les réponses à ces questions, posées il y a un demi-siècle, sont désormais formulées en termes moléculaires précis.

ENCART HISTORIQUE

Les expériences sur *Acetabularia*

Ces cellules comportent une base constituée de courts stolons fixés au substrat, une tige verticale fine de plusieurs centimètres de long et un chapeau circulaire dont la forme est spécifique d'une espèce donnée (voir *figure* 8.7). Le seul noyau de cette cellule se situant au niveau des stolons, ce matériel se prête à des expériences simples de mérotomie ou de greffe de noyaux. Un premier résultat, surprenant, est que l'énucléation ne conduit à la mort de la cellule qu'après plusieurs mois de survie ; en outre, l'ablation du chapeau d'une algue récemment énucléée est souvent suivie de la régénération complète de l'organe perdu. La nutrition et une capacité de morphogenèse se maintiennent donc pendant une durée anormalement longue ; pour réconcilier ces observations avec les données plus anciennes, Hämmerling suggéra l'existence de substances morphogènes issues du noyau, actives dans le cytoplasme et particulièrement abondantes ici, eu égard à la taille importante de la cellule d'*Acetabularia*.

De nombreuses expériences de greffes interspécifiques de cellules nucléées ou non, suivies ou non d'ablation du chapeau, confirment l'existence de telles substances, en montrant que le noyau détermine indirectement la morphologie du chapeau, au moyen de molécules spécifiques dont la durée de vie est limitée (voir *figure* 8.8). D'autres manipulations ont prouvé, de façon symétrique, que le cytoplasme influence le comportement du noyau. Dans le cycle normal de l'algue, ce dernier ne se divise que lorsque le chapeau est complètement différencié, les noyaux fils colonisant ensuite chaque lobe de celui-ci pour y former des zoospores ou des gamètes. En pratiquant l'ablation systématique du chapeau, juste avant la fin de sa régénération complète, Hämmerling a réussi à repousser indéfiniment l'entrée en division du noyau.

Il faut enfin rappeler l'existence, chez les organismes pluricellulaires, de certains types de cellules naturellement anucléées, dont le devenir confirme ce qui vient d'être décrit. Les hématies de Mammifères résultent d'un long processus de différenciation qui leur a fait perdre leur noyau : elles dérivent des érythroblastes nucléés, qui se multiplient activement, puis se transforment en érythrocytes qui perdent leur noyau pour donner en fin de compte des réticulocytes. Ces derniers continuent de synthétiser pendant quelque temps de grandes quantités d'hémoglobine et perdent peu à peu tous leurs autres organites, de sorte que les hématies sont réduites à des sacs d'hémoglobine ; leur durée de vie est alors limitée à une centaine de jours.

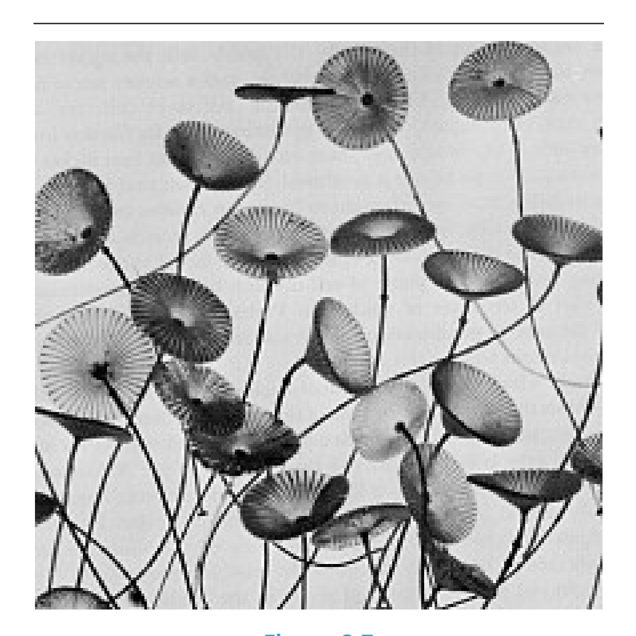


Figure 8.7

Cellules d'*Acetabularia mediterranea*

Chaque cellule est formée d'une ombrelle, dont le diamètre est de 8 mm environ, portée par un pied fin long de 4 à 5 cm. L'unique noyau est localisé à la base du pied. (Cliché Labo BG, Orsay).

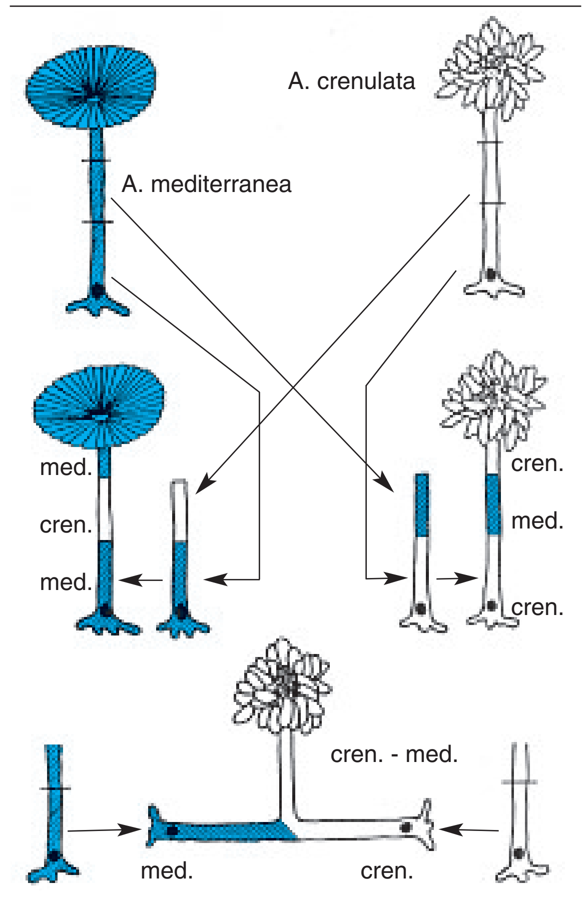


Figure 8.8

Expériences de greffes nucléaires chez *Acetabularia*

Deux espèces bien identifiables grâce à leur ombrelle sont utilisées (*A. mediterranea* et *A. crenulata*). On greffe un segment de tige d'une espèce sur le pied de l'autre, dont le noyau détermine en fait la morphogenèse de l'ombrelle. Une cellule greffée binucléée présente des caractéristiques morphologiques intermédiaires.

2.3. Le noyau : lieu d'une synthèse d'ARN exporté vers le cytoplasme

Les cytologistes ont observé depuis longtemps que le nucléole, qui contient une grande quantité d'ARN, est associé à un segment de chromosome précis, nommé **organisateur nucléolaire** ; c'est du point de vue biochimique le premier lien organique signalé entre l'ADN et l'ARN. Les techniques de coloration suggéraient aussi la présence discrète d'ARN au niveau de la chromatine elle-même, mais les résultats restaient sujets à discussion. Seule l'utilisation de molécules radiomarquées a permis d'obtenir des données irréfutables relatives aux activités de synthèse du noyau.

2.3.1. Expériences utilisant les radio-isotopes

Des cellules sont placées dans un milieu de survie contenant un précurseur radioactif spécifique de l'ARN (uracile ou uridine marqués à ^{3}H ou ^{14}C), et on les laisse incuber quelques minutes (***pulse*** ; voir chapitre 3) avant de les fixer et de les traiter pour l'autoradiographie. L'image obtenue montre que la synthèse d'ARN (transcription) est pour l'essentiel localisée dans le noyau ; elle est particulièrement active au niveau du nucléole, mais on obtient aussi une réponse significative au niveau de la chromatine extranucléolaire. En microscopie électronique, on précise que seule la chromatine diffuse est responsable de ce dernier marquage. Nous verrons plus loin que ce ne sont pas les mêmes ARN qui sont synthétisés dans le nucléole et au niveau de la chromatine. Dans ce genre d'expériences conduites *in vivo*, il existe toujours un marquage faible mais reproductible, au niveau du cytoplasme ; sa signification n'a pas été interprétée correctement dès le début, mais on connaît maintenant son origine : il s'agit de la synthèse d'ARN propre aux organites semi-autonomes.

Une deuxième donnée importante relative au métabolisme de l'ARN a été obtenue à partir d'expériences classiques de ***pulse-chase***. Après incubation dans une solution radioactive identique à la précédente pendant environ 10 minutes, les cellules sont mises en survie dans un deuxième milieu normal. On analyse au cours du temps, sur des échantillons différents traités séparément pour l'autoradiographie, le devenir intracellulaire de la radioactivité incorporée au cours du *pulse*. Les premiers résultats, obtenus sur des amibes (Goldstein et Plaut, 1955), démontrent que tous les ARN (ou au moins une majorité d'entre eux) fabriqués dans le noyau, migrent ensuite vers le cytoplasme, où ils ont une durée de vie limitée. Le transfert est unidirectionnel comme le prouvent clairement les expériences de greffe suivantes : un noyau radiomarqué d'amibe vivante est transféré par microchirurgie dans une cellule nucléée de la même espèce, mais n'ayant pas elle-même incubé dans un milieu radioactif. Au cours de la période de chasse, on constate par autoradiographie que le noyau transplanté se vide progressivement de sa radioactivité au profit du cytoplasme de la cellule receveuse, alors que le noyau de cette dernière ne se marque jamais (voir *figure* 8.9). De même, en greffant un noyau de cellule non marquée dans une cellule marquée elle-même énucléée, on n'observe jamais de radioactivité dans le noyau introduit ; ceci démontre que le marquage d'origine spécifiquement cytoplasmique signalé plus haut ne migre pas vers le compartiment nucléaire.

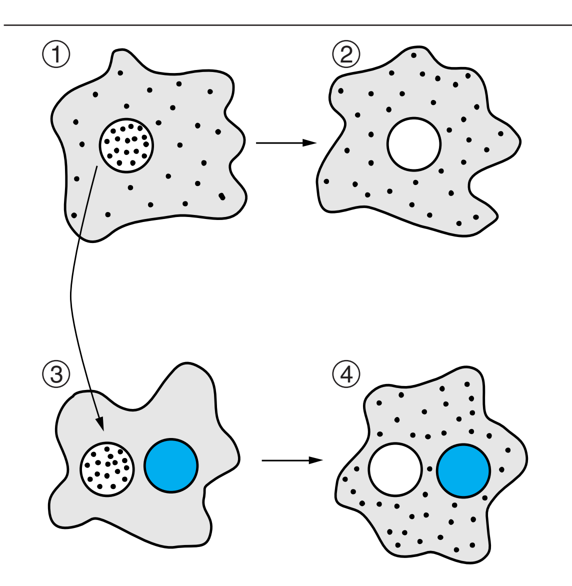


Figure 8.9

Expériences historiques sur la synthèse et le devenir des ARN dans les cellules eucaryotiques (amibes)

(1) Expérience de *pulse* (10 minutes d'incubation en présence d'uracile ^{3}H), suivie d'une autoradiographie, montrant que le noyau est le lieu d'une synthèse intense d'ARN. **(2)** Expérience de chasse (90 minutes en milieu normal, après le pulse), montrant que la radioactivité a quitté le noyau. **(3)** et **(4)** Greffe d'un noyau radioactif dans une cellule normale, suivie d'une période d'incubation de 90 minutes, montrant que le noyau initial ne récupère aucune radioactivité.

L'ARN synthétisé dans le noyau migre donc vers le cytoplasme, où il s'accumule et où il est amené à accomplir ses fonctions (inconnues, à l'époque), éventuellement «à côté» de celui qui est synthétisé sur place, en faible quantité. Cette propriété distingue fondamentalement les deux espèces d'acides nucléiques trouvées dans la cellule : 1) l'ADN, qui reste confiné dans le noyau tout au long de la vie de la cellule (excepté la période de division), où il est métaboliquement stable en dehors des événements de synthèse réplicative préparant la division, 2) l'ARN, qui est essentiellement fabriqué dans le noyau, mais qui est en revanche une espèce moléculaire mobile, dont la durée de vie est limitée dans le cytoplasme, lieu de son activité (voir plus loin).

Toutes ces expériences démonstratives, conduites chez les Eucaryotes, auraient été impossibles à concevoir et à réaliser chez des Bactéries, d'une part pour des raisons techniques évidentes, mais aussi à cause de leur absence de compartimentation. Nous avons cependant vu que ces dernières ont été irremplaçables pour l'identification du matériel génétique et pour l'analyse du rôle des différentes familles d'ARN dans les mécanismes complexes de la synthèse protéique (voir chapitre 4). Pour compléter ce point, il faut enfin mentionner l'existence inhabituelle d'une importante synthèse d'ARN au niveau de chromosomes très particuliers, dits **chromosomes géants**, qui n'ont rien à voir avec les chromosomes métaphasiques banals, condensés et totalement inactifs de ce point de vue. L'importance de ce matériel, que nous étudierons plus loin, tient au fait qu'il permet de visualiser directement le processus de recopiage de l'ADN en ARN, et d'analyser parfaitement ses caractéristiques moléculaires.

2.3.2. Correspondance entre présence d'ARN et activité de synthèse protéique

L'observation d'une relation entre la quantité de protéines synthétisées par une cellule et sa

teneur en ARN est relativement ancienne, et liée au développement de la cytochimie. Les cellules du pancréas exocrine des Vertébrés, par exemple, spécialisées dans une sécrétion abondante d'enzymes hydrolytiques (déversées dans le tube digestif), sont très riches en ARN, comme le montrent les analyses biochimiques. En revanche, on trouve peu d'ARN dans les cellules musculaires striées qui, une fois différenciées, contiennent des protéines en abondance (les plus connues étant l'actine et la myosine), mais en fabriquent très peu. Cette corrélation est renforcée par des expériences de physiologie cellulaire utilisant les radio-isotopes et permettant de mesurer des taux instantanés de synthèse d'ARN.

Un grand nombre d'observations atteste qu'en l'absence de tout ADN, les ARN suffisent pour assurer la synthèse des protéines dans la cellule. La plus simple est fournie par les expériences d'incorporation *in vivo* d'acides aminés radioactifs dans les protéines, qui montrent, après autoradiographie, que ce processus a lieu exclusivement dans le cytoplasme (ce qui n'exclut d'ailleurs pas un transport secondaire vers le noyau). Les expériences d'énucléation ont aussi démontré que les synthèses protéiques peuvent se poursuivre pendant un temps plus ou moins long après la perte du noyau : de quelques jours chez l'amibe, à quelques semaines chez l'acétabulaire ! Dans ce dernier cas, on a de plus observé une corrélation étroite entre la disparition des ARN cytoplasmiques et la diminution progressive de l'activité de synthèse des protéines. On rappelle enfin que des systèmes artificiels de synthèse protéique *in vitro*, constitués de fractions cellulaires hautement purifiées contenant des ARN, mais pas d'ADN, ont été mis au point dans les années 50.

La mérotomie, qui n'est réalisable que sur des organismes unicellulaires favorables, a été remplacée par l'utilisation de drogues bloquant spécifiquement l'activité de transcription du noyau : on réalise ainsi une véritable **énucléation chimique** de la cellule qui a, en outre, l'avantage d'être parfois réversible. Certains antibiotiques, extraits de Bactéries ou de Champignons, sont des poisons du noyau et, en se combinant à l'ADN chromosomique, ils bloquent complètement son activité de transcription. Lorsque des cellules sont incubées en présence d'une substance telle que l'**actinomycine D**, par exemple, on observe les mêmes effets globaux que ceux décrits plus haut pour les énucléations chirurgicales. L'intérêt évident de cette technique est qu'elle peut s'appliquer à de grands nombres de cellules (cultures de cellules, tranches d'organes), et qu'elle autorise ainsi une analyse biochimique approfondie, inconcevable jusque-là. On constate alors que toutes les activités cellulaires ou les synthèses protéiques ne « s'éteignent » pas à la même vitesse. Les différences de délai mesurées tiennent à la durée de survie intrinsèque des protéines elles-mêmes (suivant aussi qu'elles sont solubles, ou bien incluses dans des structures ou des organites, ce qui les stabilise), ainsi qu'à la quantité absolue et/ou à la stabilité des molécules messagères stockées dans le cytoplasme avant l'arrêt de l'activité nucléaire.

2.3.3. Conclusions générales sur le rôle du noyau

Cet organite contrôle toutes les activités cellulaires en fabriquant une catégorie de molécules intermédiaires entre l'ADN et les protéines : l'ARN, dont l'action s'exerce dans le cytoplasme à travers la synthèse des protéines. La compartimentation stricte de l'information génétique chez les Eucaryotes doit être rapprochée, d'une part, de la complexité des processus biochimiques qui se déroulent au sein du noyau (voir plus loin) mais aussi, d'autre part, du degré élevé d'organisation du cytoplasme, dont on connaît la richesse en organites variés. Certains auteurs suggèrent que toutes les activités dynamiques de ce dernier liées, en particuler, à la présence du cytosquelette (voir chapitre 11) sont incompatibles avec le bon fonctionnement des longues molécules fragiles que sont les chromosomes actifs en transcription.

Les expériences décrites jusqu'ici ne rendent pas compte du fait que les différents ARN interviennent de manières très diverses dans la synthèse protéique ; seules les approches conjointes de la biochimie et de la biologie moléculaire, développées à partir des années 60, ont été en mesure d'identifier les mécanismes en jeu (voir chapitre 4). Ces approches ont contribué en outre à montrer, à partir des années 70, que les processus génétiques fondamentaux évoqués à propos de la cellule eucaryotique dans son entier, sont aussi applicables à des compartiments de ces mêmes cellules. Il s'agit des mitochondries et des plastes qui, pour cette raison, seront qualifiés d'**organites semi-autonomes**, même s'ils sont très largement dépendants de l'expression du noyau pour leur survie propre dans la cellule.

Pour conclure ce développement sur le rôle général du noyau, on peut signaler l'existence de maladies auto-immunes assez fréquentes, qui concernent certains constituants biochimiques de cet organite, contre lesquels l'organisme se met à fabriquer des anticorps ; voir l'encart suivant.

3. LES CHROMOSOMES GÉANTS ET LEUR ACTIVITÉ

La fonction des chromosomes métaphasiques est essentiellement mécanique et liée au processus de répartition égale du matériel génétique (voir chapitre 12) ; elle est incompatible avec les étapes initiales de l'expression du génome. Il existe deux exceptions à cette règle, connues depuis fort longtemps à cause du caractère remarquable de la taille et de la morphologie de ce que l'on nomme les **chromosomes géants** ; il s'agit des **chromosomes polyténiques** (ou polytènes), et des **chromosomes en écouvillon**. La compréhension de l'architecture moléculaire et du rôle physiologique original de ces structures a constitué une étape importante dans l'histoire de la connaissance des mécanismes de l'expression du génome eucaryotique.

3.1. Chromosomes polyténiques

3.1.1. Morphologie et organisation

Ces structures géantes, qui se présentent sous l'aspect de filaments de 0,5 mm de long environ, sur 10 µm de diamètre, sont paradoxalement rencontrées dans les noyaux interphasiques de certaines cellules d'Insectes ou de quelques Protistes ciliés ; elles ont été découvertes par Balbiani, en 1881, chez la larve du chironome (ver de vase des pêcheurs). Leur particularité remarquable est une fine striation transversale, visible au microscope

Encart biomédical

Le lupus érythémateux systémique

Cette maladie auto-immune chronique se traduit par divers symptômes inflammatoires responsables d'affections cutanées (érythème facial, en particulier), d'une insuffisance rénale grave et parfois fatale, d'atteintes cardiovasculaires et respiratoires et d'une arthrite. Elle touche dix fois plus fréquemment les femmes que les hommes, et concerne une femme sur 1000 environ, d'âge compris entre 20 et 60 ans. L'origine de cette affection, dont l'évolution est souvent imprévisible, reste largement inconnue (bien que plusieurs facteurs de prédisposition génétique aient été identifiés).

Elle est caractérisée par la production massive d'auto-anticorps dirigés contre un ou plusieurs constituants des noyaux cellulaires. On peut citer, parmi les protéines antigéniques : les histones, des protéines chromosomiques non-histones, des protéines participant à la structure des particules dites snRNP (complexes ribonucléoprotéiques qui participent aux processus d'excision/épissage des pré ARNm). Des anticorps anti ADN, très caractéristiques de cette affection, ont également été signalés. Le pronostic du lupus est établi en particulier grâce à la détection, par immunofluorescence indirecte, des auto-anticorps sériques antinucléaires visualisés sur des cellules en culture.

Un dérèglement du contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules immunitaires (lymphocytes B et plasmocytes), qui sont hyperstimulées par des interleukines, conduit à la production de plusieurs grammes d'immunoglobulines par jour ! L'accumulation des complexes immuns dans tout l'organisme, au sein des tissus et des vaisseaux sanguins, est responsable de la réaction inflammatoire généralisée et d'une glomérulonéphrite (le filtre rénal est obstrué). Divers facteurs hormonaux (grossesse) ou environnementaux (lumière solaire) peuvent en outre provoquer des poussées subites de la maladie.

Dans la mesure où les causes profondes de cette maladie sont inconnues, il n'existe pas de vrai traitement curatif ; l'utilisation de composés anti-inflammatoires ou une corticothérapie permettent de stopper la progression des manifestations cliniques. Dans les cas graves, l'application d'un traitement immunosuppresseur peut être recommandée, afin de limiter la multiplication des lymphocytes.

photonique lorsqu'on utilise les colorants cytologiques habituels de la chromatine (voir *figure* 8.10). Les cellules contenant ces chromosomes sont elles-mêmes géantes et ont un diamètre de 200 à 250 µm ; on les rencontre pour l'essentiel dans divers tissus des larves de certains Insectes (Diptères et Collemboles). Quelques rares tissus chez l'adulte contiennent aussi ces structures nucléaires.

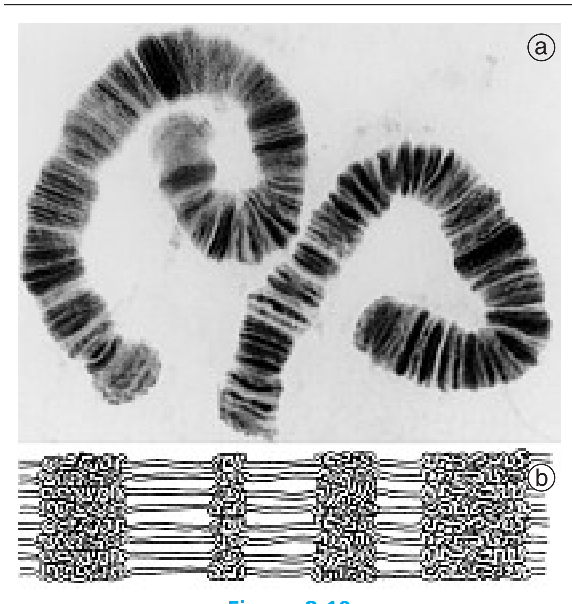


Figure 8.10

Chromosomes polyténiques des glandes salivaires de *Chironomus tentans*

Ces organes, aisément isolables et observables sans préparation spéciale, sont très faciles à colorer. **(a)** La fine striation transversale caractéristique de ces chromosomes est bien visible ; le phénomène d'endoréplication conduisant à leur formation est ici très marqué et c'est dans ce tissu qu'ils sont les plus gros (cliché J. Orcival, Bât. 400, Orsay). **(b)** Schéma expliquant l'origine des bandes plus ou moins colorées dans les chromosomes polyténiques. Les filaments-frères ne se séparant pas et restant étroitement accolés les uns aux autres au cours des cycles de réplication, le nombre de chromatides croît exponentiellement, puisque chacun d'eux sert de nouvelle matrice. L'épaisseur variable des bandes est due à la différence de quantité de matériel coloré contenue dans les chromomères correspondants. Les interbandes, qui ne contiennent que 15 % de l'ADN, apparaissent en clair.

L'organisation particulière de ces chromosomes est due à la présence d'un très grand nombre de chromatides partiellement condensées et accolées point par point sur toute leur longueur. Le processus responsable de cette situation « anormale » par rapport aux chromosomes habituels, est nommé **polyténie**. Il s'agit d'un phénomène de réplications successives des chromatides ayant lieu au sein d'un même noyau, appelé **endoréplication**. On constate en outre que le noyau de ces cellules ne contient que n chromosomes géants alors que, comme toute cellule somatique, elle devrait en contenir $2n$. La raison est que les deux homologues de chaque paire se sont appariés sur toute leur longueur avant d'engager les cycles d'endoréplication signalés plus haut (le processus d'appariement est caractéristique du début de la méiose). Le résultat, dans le cas des glandes salivaires de chironome, est que chaque chromosome géant (4 par noyau) contient, après neuf cycles de doublement, 1 024 chromatides accolées, d'où leur grande épaisseur. Le degré de polyténisation varie d'un tissu à l'autre et n'est pas toujours aussi élevé.

La longueur de ces chromosomes est due à une spiralisation incomplète, par rapport à celle réalisée dans les chromosomes métaphasiques. La condensation a seulement lieu au niveau de zones localisées, où se concentre la majeure partie de l'ADN initial : ce sont les **chromomères**, constitués de minuscules pelotons d'ADN organisé sous forme de chromatine. Comme toutes les chromatides accolées sont sœurs ou homologues, leur profil de condensation est identique : les zones chromomériques juxtaposées sont donc responsables de la striation transversale observée (voir *figure* 8.10). La taille et le profil des bandes et des interbandes sont caractéristiques de l'espèce même si certaines variations sont détectables d'un tissu à l'autre chez un même individu, ou au cours du temps dans un même tissu (voir plus loin).

Bien évidemment, les cellules possédant des chromosomes polyténiques ne subiront jamais de mitose ; lors de la métamorphose de l'Insecte, elles seront pratiquement toutes destinées à la disparition par **histolyse** (destruction des tissus). Les activités qui les caractérisent (sécrétion d'enzymes digestives, de soie…) traduisent une spécialisation précise de leur noyau, la polyténie s'inscrivant ainsi dans la série des différents mécanismes associés à la différenciation cellulaire.

Chez le chironome, le nombre de bandes et interbandes reconnaissables en cytologie photonique atteint 2 000 ; la drosophile, qui est l'organisme le mieux étudié à cet égard (en liaison avec les analyses de génétique formelle) en contient plus de 5 000. On estime ainsi que, selon leur épaisseur, celles-ci contiennent entre 3.10^3 et 3.10^5 paires de nucléotides par chromatide. Toutes ces bandes sont répertoriées grâce à un système de

lettres et de nombres, qui permet d'analyser des situations physiologiques diverses chez un organisme donné, de comparer la structure des génomes chez des espèces voisines et même, dans de nombreux cas, de déterminer l'emplacement des gènes par rapport au profil de striation.

3.1.2. Activité transcriptionnelle des chromosomes polyténiques

Une autre caractéristique morphologique de ces chromosomes est la présence, en des endroits précis, de dilatations diffuses et de grande taille, prenant mal les colorants. On appelle ces structures des nodules ou des ***puffs*** (boursouflures) ; on utilise aussi l'expression : **anneaux de Balbiani** (qui les avait déjà observés). L'utilisation de colorants tels que la pyronine, et la mise en évidence de l'incorporation de précurseurs d'ARN radioactifs à leur niveau, montrent que les *puffs* sont essentiellement constitués d'ARN, qui est transcrit au niveau de segments déroulés des chromatides (voir *figure* 8.11). Il existe une corrélation directe entre la taille des *puffs* et leur activité de transcription instantanée ; l'actinomycine D entraîne leur régression rapide. Du point de vue moléculaire, on considère que le nucléofilament de chromatine est déroulé en un longue boucle, au niveau de chaque chromomère d'une bande active donnée. La microscopie électronique montre dans ces boucles des figures de **complexes de transcription**, que nous décrirons en détail plus loin, et qui sont désignées sous le nom d'**arbres de Noël**. L'ensemble des boucles actives émergeant en un même point des chromatides constitue la structure boursouflée et diffuse, décrite auparavant. Par leur taille, les *puffs* constituent des situations extrêmes, mais de très nombreuses bandes, plus discrètes, et où l'ADN est moins déployé, sont aussi actives et synthétisent de l'ARN (voir *figure* 8.12).

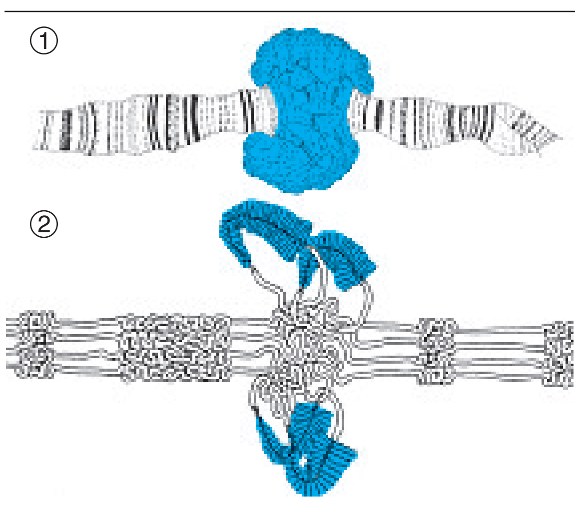


Figure 8.11

Morphologie et organisation moléculaire d'un *puff* dans un chromosome polyténique

(1) Aspect en microscopie photonique. **(2)** Interprétation schématique de son origine. L'ouverture d'une boucle au niveau de chaque chromomère est liée à la mise en route de la transcription (présence d'un «arbre de Noël» sur chaque boucle). L'ensemble des boucles forme une boursouflure caractéristique, riche en ARN, comme le montrent les test cytochimiques ou l'autoradiographie après incorporation d'uracile radioactif.

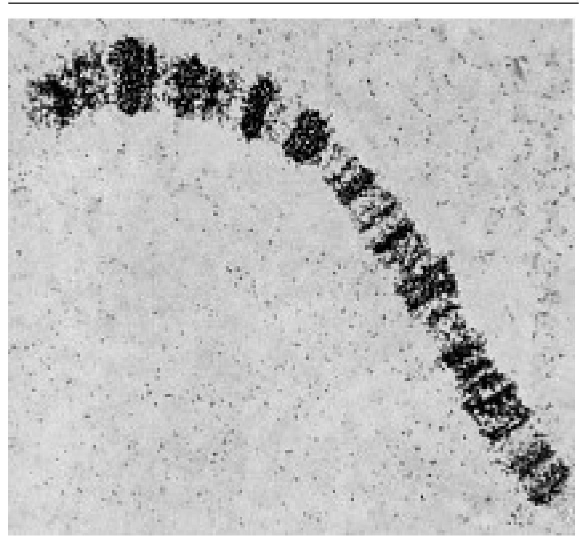


Figure 8.12

Aspect d'un chromosome polyténique après incorporation de longue durée d'uracile radioactif et autoradiographie

Un très grand nombre de bandes apparaissent marquées, ce qui témoigne d'une synthèse d'ARN à leur niveau. (D'après un cliché de C. Pelling, 1964).

L'intérêt fondamental de ces chromosomes tient au fait qu'ils ont constitué la première illustration directe de l'activité des gènes. Dès 1952, Beerman a en effet décrit chez le chironome des variations fines de leur morphologie, selon les différents tissus larvaires et le stade de développement. Certains *puffs* sont communs à tous les tissus, mais d'autres sont typiques d'un seul. On observe de plus des modifications temporelles bien déterminées des profils des bandes au cours de l'histoire d'un seul type cellulaire : des *puffs* se mettent à fonctionner alors que d'autres se résorbent progressivement et

disparaissent. Un exemple classique de contrôle de l'activité des *puffs* par une hormone stéroïde chez la drosophile sera donné plus loin.

Les *puffs* constituent un exemple très démonstratif du phénomène de transcription à l'échelle cellulaire ; ils prouvent en outre qu'un des éléments du contrôle de l'activité des gènes est le degré de condensation plus ou moins important de la chromatine. En combinant la cytologie à d'élégantes études génétiques, Beerman a en effet montré chez le chironome que l'on pouvait associer un type donné de *puff* à une sécrétion protéique particulière, et il a conclu qu'un état différencié résulte du contrôle de l'expression des gènes. Lorsqu'elle fut ainsi formulée, cette idée, aujourd'hui banale, n'était pas encore fondée sur des bases expérimentales très solides. Le comportement physiologique des bandes des chromosomes polyténiques vis-à-vis des facteurs internes et externes mime ce qui est attendu de la part des gènes individuels, mais il apparaît cependant que l'hypothèse simple d'« une bande = un gène » est erronée, même si le nombre de bandes visibles et le nombre de gènes postulés sont du même ordre de grandeur.

3.2. Chromosomes en écouvillon

3.2.1. Morphologie et organisation

Ces structures sont observées dans les ovocytes de la plupart des Métazoaires, au stade diplotène de la méiose. Comme pour les chromosomes polytènes, il s'agit en général de cellules géantes, dont le diamètre peut atteindre plusieurs mm. C'est dans les ovocytes d'Amphibiens que Flemming les a décrits pour la première fois, en 1882. Le noyau de ces cellules, lui-même géant, contient des chromosomes très particuliers dont la longueur peut atteindre 1,5 mm (voir *figure* 8.13). Cette morphologie n'est en fait évidente que sur des chromosomes isolés manuellement, à partir de noyaux microdisséqués *in vitro*. Les coupes cytologiques sont toujours trop fines pour qu'on voie l'intégrité de leur structure complexe, car certaines boucles atteignent plusieurs dizaines de µm de long.

Chaque chromosome homologue est clivé en deux chromatides sœurs identiques, étroitement accolées sur toute leur longueur, car la réplication du matériel génétique a eu lieu au cours de l'interphase précédant l'entrée en méiose ; au sens strict, on appelle chromosome en écouvillon l'un ou l'autre des deux homologues associés. Leur axe est ponctué de granules de 0,5 à 2 µm de diamètre, qui représentent des zones de condensation importante des chromatides accolées, et sont des chromomères équivalents à ceux décrits plus haut. Deux boucles symétriques de même longueur, qui sont des expansions latérales des deux chromatides sœurs, émergent de chaque chromomère : leur séquence, leur contenu génétique et leur organisation sont identiques. De plus, comme les deux homologues de la paire ont globalement la même information génétique, la séquence des boucles et des chromomères est identique ; les quatre chromatides du bivalent présentent donc exactement la même morphologie.

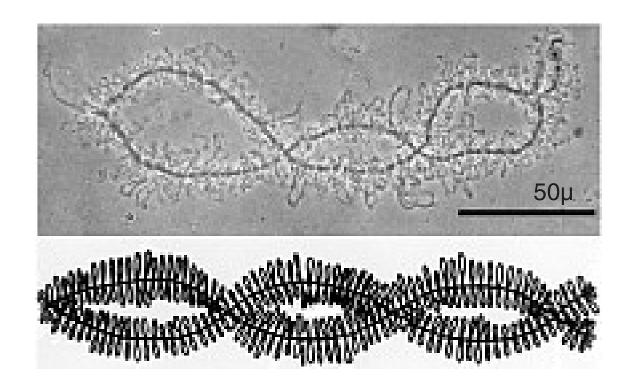


Figure 8.13

Cliché d'un chromosome en écouvillon chez un Amphibien *(Pleurodeles)*

Ces structures, dont l'organisation est très diffuse, sont plus difficiles à observer que les chromosomes polyténiques. Elles apparaissent sous la forme d'axes fins, pourvus de nombreuses boucles latérales qui leur donnent un aspect typique traduit par les expressions : chromosomes plumeux ou *lamp-brush*.
Les deux homologues de la cellule en méiose sont appariés en bivalents, mais ils restent accrochés seulement par quelques points appelés chiasmas (4 sont visibles sur ce cliché). Chaque homologue est clivé en deux chromatides sœurs accolées identiques, portant chacune une boucle, comme le présente le schéma.
(Cliché J.-C. Lacroix).

Le nombre total de boucles répertoriées le long de l'axe atteint dans certains cas 10^4 unités ; leur longueur moyenne de 30 à 50 µm correspond à environ 10^5 paires de nucléotides. Chez divers Amphibiens (en particulier les tritons, dont les génomes sont de très grande taille), on observe des boucles géantes mesurant jusqu'à 150 µm de long ; elles permettent d'identifier précisément les chromosomes qui les portent. Comme certaines boucles

présentent des tailles et des structures spécifiques (présence d'une matrice ribonucléoprotéique plus ou moins épaisse ou granuleuse), le long de l'axe d'un chromosome donné, et à un stade ovocytaire précis, on peut établir une carte précise de chacun d'eux, après avoir défini des points de repère spécifiques (voir *figure* 8.14).

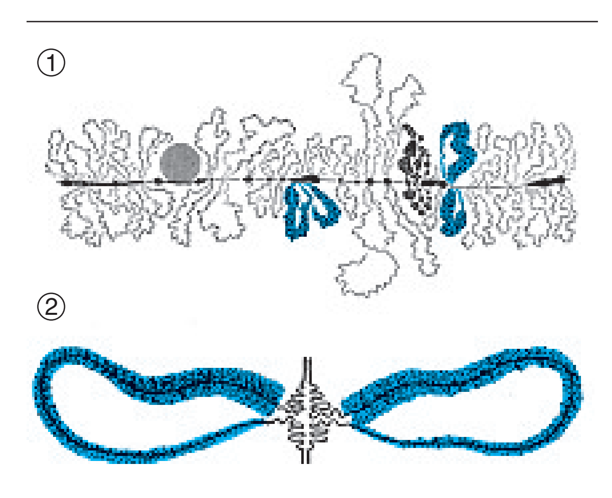


Figure 8.14

Représentation détaillée d'un segment de chromosome en écouvillon chez *Pleurodeles*

Comme pour les chromosomes polyténiques, le double nucléofilament constituant l'axe de la structure est continu d'un bout à l'autre, et toutes les différenciations longitudinales résultent simplement d'une spiralisation locale plus ou moins importante.
(1) La majorité de l'ADN (95 %) est située au niveau des chromomères (schéma de J.-C. Lacroix). **(2)** Aspect de deux boucles-sœurs émergeant de l'axe d'un chromosome, montrant la matrice fibreuse d'ARN, dont l'épaisseur s'accroît d'un bout à l'autre de la boucle.

3.2.2. Activité transcriptionnelle des chromosomes en écouvillon

De même que pour les chromosomes polyténiques, diverses techniques montrent que les boucles des chromosomes plumeux sont le lieu d'une intense synthèse d'ARN. La microscopie photonique avait déjà montré, dans le cas des boucles géantes de triton, l'existence d'un fin feutrage (nommé matrice, plus haut) présentant la particularité d'avoir une épaisseur croissante d'un bout à l'autre de la boucle (voir *figure* 8.15). La microscopie électronique a permis de généraliser cette observation à toutes les boucles : elle montre que ce feutrage représente en fait des molécules individuelles d'ARN en cours de synthèse le long de l'ADN ; beaucoup de boucles sont ainsi transcrites de façon continue, d'une extrémité à l'autre. Des centaines de copies, chacune à un stade différent dans le processus de transcription, mais qui seront finalement toutes identiques, marquent les limites d'une unité fonctionnelle. Ces **complexes de transcription** spectaculaires sont la visualisation directe de l'activité des gènes, dont on voit alors clairement, le long de la chromatide déroulée, le point d'initiation et le point de terminaison de la transcription. Ces images montrent aussi l'existence de segments de chromatine nue, non transcrite, entre les gènes ainsi définis. L'aspect général est celui d'une succession d'**arbres de Noël**, qui se suivent avec la même polarité ou avec une polarité opposée (voir *figure* 8.15) ; nous reviendrons plus tard sur l'organisation moléculaire précise de ces structures.

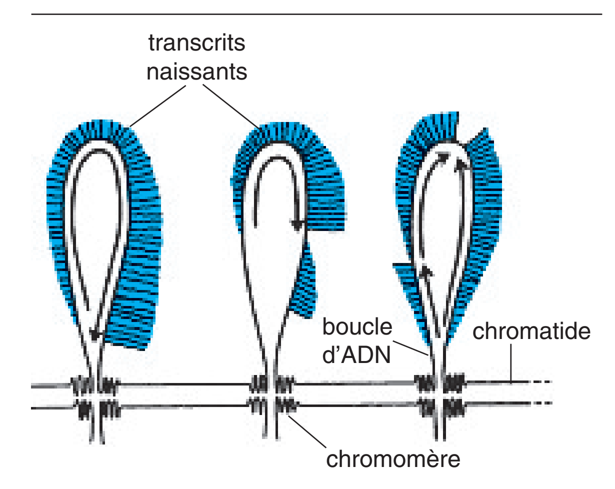


Figure 8.15

Différents cas de figure de complexes de transcription, uniques ou multiples, observés dans les boucles des chromosomes en écouvillon

Noter que la polarité des complexes, au sein d'une boucle, peut être identique ou opposée. Les flèches indiquent le sens de la transcription.

Si les ARN transcrits le long de ces longues boucles d'ADN en représentent une copie conforme, on doit s'attendre à ce que leurs masses moléculaires atteignent des valeurs considérables. De fait, ceci est confirmé par les études biochimiques conduites sur les ARN extraits des noyaux correspondants. Nous verrons plus loin que la longueur, en apparence anormalement courte, des transcrits en fin de synthèse, est expliquée par le fait qu'ils se recouvrent progressivement de protéines et se pelotonnent de manière importante à la suite de ce phénomène. Ce sont donc en réalité

des complexes ribonucléoprotéiques de grande taille, et non pas des ARN nus, qui sont ainsi visualisés.

La diversité des boucles tient au fait qu'elles peuvent posséder des segments plus ou moins longs de chromatine non transcrite, ou représenter une ou plusieurs unités de transcription, plus ou moins rapprochées, avec des polarités variées. Cette spécificité morphologique reflète la spécificité de l'information génétique au niveau moléculaire ; celle-ci est maintenant analysée grâce à des **sondes** d'acides nucléiques ou de protéines, qui permettent de repérer cytologiquement des ARN ou des protéines connus (voir chapitre 3). On a ainsi localisé les gènes des ARN ribosomiques, des ARN de transfert, et de plusieurs ARN messagers abondants (par exemple : les histones) ; pour chacun de ces types de gènes, en général seul un petit nombre de boucles est marqué de façon spécifique. De même, il est possible de visualiser des protéines particulières (de structure ou enzymatiques) au sein des boucles.

Les chromosomes en écouvillon sont sensibles aux inhibiteurs de la transcription : l'incubation des ovocytes dans l'actinomycine D induit rapidement la disparition de la matrice des boucles, qui se raccourcissent et réintègrent l'axe chromosomique sous forme de chromomères. Ce phénomène existe aussi dans les conditions naturelles ; les chromosomes en écouvillon étant rencontrés dans les ovocytes, dont le développement complet s'échelonne sur plusieurs mois, leur morphologie varie au cours du temps. Dans les phases de croissance rapide des ovocytes, en particulier lors de l'entrée en vitellogenèse, les boucles sont développées et très actives, en liaison directe avec une activité cellulaire intense. À la fin de l'ovogenèse, quand les ovocytes ont atteint leur taille maximale et qu'ils entrent dans une phase de repos physiologique, les boucles se résorbent en même temps que la transcription cesse.

4. CARACTÈRES SPÉCIFIQUES DE LA TRANSCRIPTION CHEZ LES EUCARYOTES

L'existence de l'enveloppe nucléaire chez les Eucaryotes conduit de fait à une séparation physique et temporelle obligatoire des processus de transcription et de traduction dans deux compartiments distincts : le noyau et le cytoplasme. Contrairement à ce qui se passe pour les Procaryotes, il est possible, en utilisant les méthodes du fractionnement cellulaire, d'identifier précisément les espèces moléculaires qui les caractérisent, et d'analyser les mécanismes mis en jeu dans chacun d'eux. Nous n'évoquerons pas ici les processus génétiques fondamentaux associés aux mitochondries ou aux plastes ; ces compartiments ont leur histoire propre de ce point de vue, qui est voisine de ce que l'on a décrit chez les Procaryotes dans le chapitre 4.

4.1. Données de la biochimie

4.1.1. Les différentes catégories d'ARN nucléaires et cytoplasmiques et leurs caractéristiques

Lorsqu'on soumet à la centrifugation ou à l'électrophorèse les populations d'ARN extraites soit du noyau, soit du cytoplasme, les résultats obtenus sont complètement différents à plusieurs égards.

• Les **ARN cytoplasmiques** (ARN des organites exclus) : sur la base de critères biochimiques et fonctionnels, on distingue trois familles de molécules, qui ont déjà été présentées dans le chapitre 4 (voir *figures* 8.16 et 8.17) :

– les **ARN ribosomiques** ; ils sont extraits des ribosomes, dont ils font partie intégrante. Ce sont les ARN les plus abondants : ils représentent environ 80 % du total. Il en existe quatre espèces distinctes : une associée à la petite sous-unité (ARN 18 S) et trois associées à la grosse sous-unité (ARN 28 S, 5,8 S et 5 S) ; l'organisation des ribosomes a été décrite dans le chapitre 4 ;
– les **ARN de transfert** ; ils sont de petite taille (4 S), très divers, et relativement abondants (environ 15 % de la masse). Bien que légèrement plus gros que ceux décrits chez les Procaryotes, leurs caractéristiques générales, structurales et fonctionnelles sont tout à fait semblables ;
– les **ARN messagers** ; peu abondants (environ 5 %), ils constituent une population hétérogène puisqu'ils représentent les messages génétiques utilisés pour la fabrication des protéines. Il en existe plusieurs milliers ou dizaines de milliers d'espèces distinctes à tout instant dans une cellule standard. Cependant, dans le cas de cellules différenciées et spécialisées dans la production

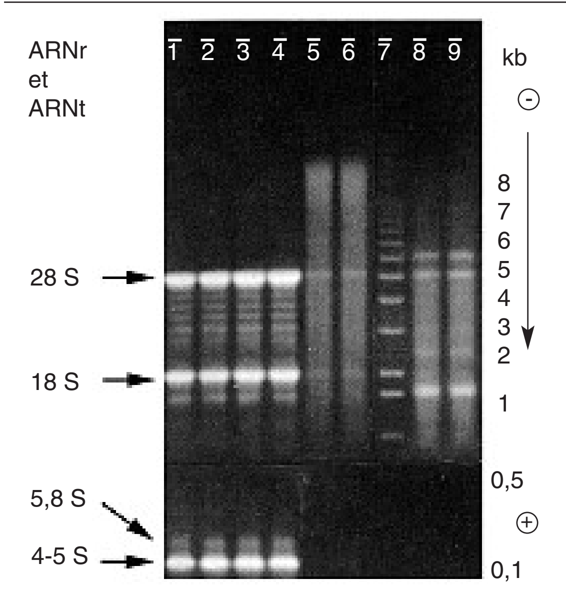


Figure 8.16

Aspect d'un gel d'électrophorèse montrant les différentes populations d'ARN extraites du cytoplasme de cellules animales

Canaux 1 à 4 : ARN cytoplasmiques totaux ; 1 et 2 : cellules de rate ; 3 et 4 : cellules de muscle strié.
Canaux 5, 6, 8 et 9 : ARN messagers purifiés (ARN poly A^{+}) ; 5 et 6 : cellules de rate ; 8 et 9 : cellules de muscle strié.
Canal 7 : marqueurs de masse moléculaire (kb).
Les différents ARNr et les ARNt, très abondants, sont bien visibles dans les canaux 1 à 4 ; les ARNm, minoritaires, y sont invisibles (c'est pour cela que cette population est longtemps restée ignorée). On voit bien que les ARNm purifiés sont très hétérogènes quant à leur taille, et qu'ils sont différents dans les deux populations de cellules. (Labo BG, Orsay).

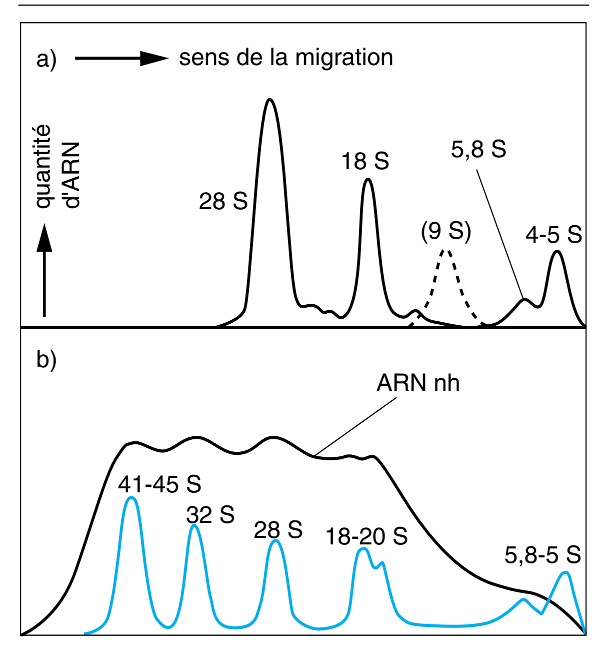


Figure 8.17

Comparaison entre les profils électrophorétiques des ARN cytoplasmiques et des ARN nucléaires

(a) ARN cytoplasmiques ; ils sont constitués par une population bien différenciée en « gros ARN » (28 S et 18 S) et « petits ARN » (5,8 S et 4-5 S). Ces catégories homogènes de molécules forment des pics bien distincts, correspondant aux bandes vues sur le gel de la figure 8.16.
(b) ARN nucléaires ; les ARN nucléolaires sont représentés par la courbe de couleur.
Les ARNm, en général très peu abondants, constituent entre les deux grandes familles d'ARN, une sorte de bruit de fond dans lequel on ne distingue rien de précis.
L'ARNm 9 S de la globine, caractéristique des érythrocytes (dont la position est marquée en pointillés), fait exception.
Les ARN nucléaires chromatiniens (ou ARNnh, courbe noire) et les ARN nucléolaires ont des profils très différents, qu'il s'agisse des tailles des molécules ou du nombre d'espèces représentées.

d'un nombre limité de protéines, certaines espèces d'ARNm peuvent devenir relativement abondantes, dépassant même 50 % du total des ARNm ; c'est le cas des érythrocytes synthétisant la globine (ARNm 9 S), des cellules de l'oviducte de poule synthétisant l'ovalbumine… L'isolement d'ARNm spécifiques a été possible dans ces seuls types cellulaires privilégiés, grâce aux techniques de centrifugation en gradient de saccharose ou d'électrophorèse préparatives. Dans tous les autres cas, la mise en évidence d'une espèce particulière d'ARNm est restée longtemps impossible, du fait de sa faible abondance. Seules les méthodes récentes d'hybridation ADN/ARN et l'utilisation de sondes nucléiques spécifiques ont permis de banaliser l'étude de l'expression d'ARNm individuels.

• Les **ARN nucléaires** : cette population est très différente de la précédente, car :

– elle présente en électrophorèse une distribution « informe », en ce sens qu'aucun pic n'émerge nettement d'une population de molécules dont la variation de taille semble continue ;
– la taille maximale des molécules extraites est beaucoup plus grande que celle observée pour les ARN cytoplasmiques. Alors que l'ARN 28 S (4 700 nucléotides) est le plus gros des ARN cytoplasmiques, on trouve en abondance dans le noyau des molécules pouvant atteindre 50 000 nucléotides de long et certaines même sont estimées à 200-300 000 nucléotides !

Si on fractionne le noyau lui-même, en isolant les nucléoles du reste de l'organite, on obtient deux profils nettement différents suivant que l'on extrait les ARN de l'un ou l'autre de ces deux nouveaux sous-compartiments :

– les **ARN nucléolaires** ont une distribution présentant des pics relativement nets, correspondant à des molécules ayant comme coefficients de sédimentation : 41-45 S, 32-35 S, 28 S, 18-20 S et 5-6 S. Ces ARN constituent donc une sous-population bien précise des ARN nucléaires totaux, mais lorsqu'ils sont en mélange avec les autres ARN, plus abondants, ils sont difficiles à identifier (voir *figure* 8.17) ;
– les **ARN nucléoplasmiques**, ou chromatiniens, sont nommés ainsi car ils sont synthétisés sur le reste de la chromatine, puis accumulés dans le nucléoplasme. Étant majoritaires dans le noyau, leur distribution globale est très semblable, par la taille des molécules et leur hétérogénéité, à celle des ARN totaux. On les appelle souvent **ARN nucléaires hétérogènes** (ARNnh). Parmi ces derniers, on a mis récemment en évidence une classe abondante de petits ARN (60-200 nucléotides environ), qui n'exercent pas leur fonction dans le cytoplasme, et restent la plupart du temps confinés dans le noyau. Ces **petits ARN nucléaires** (*sn RNA*, en anglais) entrent dans la constitution de particules ribonucléoprotéiques de petite taille dont on verra plus loin le rôle dans les processus de modification chimique de certains ARN, au sein du noyau ; il en existe, à l'heure actuelle, plus d'une douzaine d'espèces différentes.

Les ARN nucléaires et cytoplasmiques diffèrent donc à de nombreux points de vue : distribution des tailles, abondance de certaines espèces moléculaires… Les seules ressemblances portent sur les ARN nucléolaires et certains ARN cytoplasmiques pour lesquels on trouve en commun, et dans des proportions voisines, les espèces notées : 28 S, 18 S, 5,8 et 5 S. Nous comprendrons plus tard l'origine de cette observation, qui n'est pas fortuite, puisque le nucléole est le lieu de synthèse de la majorité des ARN ribosomiques.

4.1.2. Diversité des ARN polymérases chez les Eucaryotes

Bien que le principe de la transcription soit le même chez tous les êtres vivants, il existe des différences notables entre les Procaryotes et les Eucaryotes, au niveau des mécanismes ; de façon générale, les choses sont toujours plus compliquées chez ces derniers. On trouve ici trois ARN polymérases différentes, chacune étant plus grosse et plus complexe que l'unique ARN polymérase bactérienne. Chacune d'elles a une MM voisine de 10^3 kDa et comprend au moins dix chaînes polypeptidiques distinctes ; certaines sous-unités sont communes aux trois complexes. Quelques similitudes de séquence et d'organisation existent entre les plus gros des polypeptides eucaryotiques et bactériens. Ces enzymes transcrivent spécifiquement les gènes correspondant aux grandes familles d'ARN citées précédemment :

– l'ARN polymérase I synthétise tous les ARNr, sauf l'ARNr 5 S ;
– l'ARN polymérase II synthétise tous les ARNm et les « petits ARN nucléaires » ;
– l'ARN polymérase III synthétise tous les ARNt, les ARNr 5 S et l'ARN 7 S (voir *figure* 9.7).

Ces trois ARN polymérases ne se fixent sur l'ADN et ne commencent à le transcrire que si celui-ci est déjà recouvert, au niveau des promoteurs, par des protéines spécifiques appelées **facteurs de transcription** ou FT (chez les Bactéries, l'unique enzyme se fixe directement sur de l'ADN nu). L'association entre l'ADN et les facteurs de transcription, dont il existe ainsi trois familles : FTI, FTII et FTIII, est très stable, comme le montrent les expériences de reconstitution *in vitro* à partir de molécules purifiées. C'est le complexe ADN/facteurs protéiques ainsi formé au niveau du promoteur, qui « attire » et retient la polymérase correspondante, après qu'ait été constitué un volumineux **complexe de préinitiation** (voir plus loin). À la différence du facteur d'initiation sigma des Procaryotes, qui quitte l'ARN polymérase dès que le processus d'élongation de l'ARN est entamé, le complexe eucaryotique, une fois formé, reste partiellement en place après que la polymérase ait démarré. D'autres facteurs interviennent en outre spécifiquement pour contrôler le taux de transcription des gènes. La connaissance de tels facteurs chez les Eucaryotes est relativement récente et ce domaine est en pleine évolution ; ce point sera développé à la fin du chapitre.

4.2. Données de la physiologie cellulaire

Lorsque l'approche physiologique classique (de type *pulse-chase*) est doublée d'une analyse biochimique fine, après fractionnement cellulaire et/ou

chimique, on a directement accès aux relations précises existant entre les molécules marquées. Dans le cas présent, on pourra ainsi comprendre l'origine des différences importantes observées entre les ARN nucléaires et les ARN cytoplasmiques.

4.2.1. ARN nucléaires

Lors d'une expérience de type *pulse* seul, les ARN nucléaires sont les premiers marqués ; mais comment se répartit cette radioactivité instantanée au sein des différentes espèces d'ARN décrites plus haut ? On observe en fait que le profil de radioactivité se superpose presque exactement à celui traduisant la masse des ARN, ce qui signifie que tous les ARN hétérogènes (ou la majorité) sont des molécules naissantes. Lorsqu'on réalise des expériences de type *pulse-chase*, on observe que la radioactivité incorporée dans les ARN nucléaires disparaît en quelques minutes. Ceux-ci présentent donc un renouvellement (***turn-over***) très rapide, c'est-à-dire qu'ils sont soit synthétisés, puis très rapidement détruits, soit exportés hors du noyau à des taux élevés. Des mesures précises montrent en fait que seule une faible partie (5 à 10 %) de la radioactivité incorporée à tout instant dans ces molécules se retrouve dans des ARN cytoplasmiques stables, au bout de 30 minutes. Cette observation signifie que, si une partie des ARN naissants est bien exportée (comme on l'a vu par autoradiographie), la plupart d'entre eux sont très vite dégradés au sein du noyau.

La question est de savoir si cette dégradation affecte chaque molécule synthétisée, dont une faible portion serait stabilisée puis exportée, ou bien si certaines molécules sont complètement dégradées (la majorité) et d'autres simultanément stabilisées dans leur intégrité (une minorité). Nous verrons plus loin comment les longs ARN transcrits sur l'ADN sont remaniés pour donner naissance à des formes plus stables, exportées vers le cytoplasme. Le noyau des cellules eucaryotiques, lieu de la transcription, contient donc en majorité des formes moléculaires d'**ARN** de type **précurseur**, chimiquement instables car subissant de profonds remaniements avant d'être utilisables dans le cytoplasme. On rassemble sous le terme de **maturation** l'ensemble des processus chimiques qui affectent ce qu'on appellera désormais les **transcrits primaires** ; toutes les familles d'ARN sont l'objet de telles modifications, mais seules les deux premières seront analysées en détail de ce point de vue. Cette notion de relation précurseur/produit, de passage de formes instables à des formes stables, ou de maturation en général, est pratiquement inexistante chez les Procaryotes ; la simple observation du processus de transcription/traduction simultanées prouve que les ARN (au moins les ARNm) sont utilisables immédiatement après leur synthèse.

4.2.2. ARN cytoplasmiques

Si on étudie les ARN cytoplasmiques seuls (ARNm, r et t) au moyen des mêmes techniques, on observe que ces molécules sont relativement stables, voire très stables, par rapport aux durées de vie moyennes signalées pour les ARN précurseurs. Les ARNr, par exemple, persistent intacts au sein des ribosomes pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines dans certains types cellulaires. Le fait qu'ils fassent partie, avec des protéines, de structures supramoléculaires, contribue à les stabiliser en les éloignant de l'activité des ARNases. Les ARNt ont des durées de vie du même ordre de grandeur. Le cas des ARNm est un peu différent dans la mesure où une grande variabilité est observée en fonction des cellules considérées, mais leur survie dans le cytoplasme est de toute façon beaucoup plus longue que celle mesurée chez les Bactéries ; il faut dire aussi que la durée du cycle de vie (= le temps de génération) n'est pas la même dans les deux situations ! Généralement de quelques heures, la durée de vie des ARNm peut atteindre plusieurs jours ou plusieurs semaines ; c'est le cas dans les ovules des Animaux (qui sont des cellules ayant une phase de vie ralentie, pour simplifier), ou bien dans des cellules très différenciées et ne produisant qu'une, ou un nombre limité de protéines : les ARNm correspondants y sont stabilisés par des mécanismes spécifiques qui augmentent leur efficacité et leur productivité (voir plus loin). L'ensemble des données qui viennent d'être décrites pour les divers ARN cellulaires est résumé dans le tableau 8.1, qui prend pour exemple un type cellulaire standard, à savoir les fibroblastes de souris en culture.

La diversité des populations d'ARNm cytoplasmiques dans les cellules eucaryotiques a d'abord été abordée par une technique complexe, qui ne peut être développée ici ; les résultats obtenus méritent cependant d'être décrits. On montre ainsi, par exemple, que dans une cellule typique de Mammifère, qui contient environ 4.10^5 molécules d'ARNm, 15 000 espèces d'ARNm différents sont

localisation cellulaire des ARN	nature des ARN	% de la masse totale	taille des molécules d'ARN (en nombre de bases)	taux de synthèse	durée de vie (ordre de grandeur)
noyau 3 pg (11%)	précurseurs des ARNr (1)	4 %	4 700 ⟶ 13 000	39 %	très courte : seconde, minute
	précurseurs des ARNm (2)	7 %	1 500 ⟶ 30 000 (3)	58 %	très courte : seconde, minute
cytoplasme 23 pg (89 %)	ARNr	71 %	120, 160, 1 900, 4 700		longue : jour, semaine
	ARNt	15 %	≈ 80		longue : jour, semaine
	ARNm	3 %	500 ⟶ 10 000		courte : heure, jour

(1) sauf ARNr 5 S
(2) et des « petits ARN nucléaires »
(3) longueur moyenne = 8 000 ; certains dépassent 300 000 nucléotides de long.

Tableau 8.1

Caractéristiques principales des ARN présents dans une cellule typique de Mammifère

Dans cet exemple (fibroblaste de souris en culture), le noyau contient environ 6 pg d'ADN ; les ARN des mitochondries ne sont pas pris en compte. La comparaison des taux de synthèse instantanée des précurseurs des ARNm (ARNnh) et de la quantité des ARNm fonctionnels dans le cytoplasme montre que la plus grande partie des premiers est dégradée dans le noyau. Le taux de synthèse des ARNt (non mentionné dans ce tableau) ne dépasse pas 3 % du total.

mises en évidence, mais que celles-ci ne se répartissent pas de façon homogène du point de vue du nombre de copies individuelles. On distingue trois familles d'ARNm : des ARNm très abondants (ayant un nombre de copies identiques très élevé), des ARNm rares et des ARNm d'abondance intermédiaire. On observe aussi que les ARNm les plus abondants correspondent, en fait, à un nombre limité de gènes (5-10 seulement, ici) alors que les ARNm de la classe rare sont les plus diversifiés : environ 15 000 différents. Cette analyse, plus mathématique que biochimique, est un peu simpliste car il doit exister en réalité une variation continue entre les différentes classes d'ARN ; elle traduit tout de même correctement le fait que certains gènes sont plus abondamment transcrits que d'autres. Nous verrons plus loin qu'ils correspondent en général à des protéines dont la cellule a besoin en grande quantité (par exemple, certaines enzymes du métabolisme de base, ou des protéines structurales ubiquistes), tandis que d'autres, la majorité, sont transcrits avec une faible fréquence car ils codent des protéines peu représentées (protéines de régulation, enzymes intervenant dans des métabolismes annexes, ou protéines de structure impliquées dans des différenciations discrètes).

4.3. Données de la microscopie électronique

De même que chez les Procaryotes, cette approche a permis de mieux comprendre certains aspects de la transcription eucaryotique. Si la technique des coupes est totalement inefficace pour l'étude des structures fibreuses en général, en revanche, la méthode d'étalement des molécules (voir chapitre 3) s'avère très performante ; en saisissant les gènes en action, on a pu préciser la description des mécanismes en jeu.

4.3.1. Structure des complexes de transcription « arbres de Noël »

L'isolement de la chromatine à partir de noyaux dont l'enveloppe a été détruite par des détergents, et son observation au microscope électronique font

apparaître des figures de transcription typiques dites en **arbres de Noël** (voir *figure* 8.18). Nous avons déjà évoqué ces structures lors de l'étude des chromosomes géants, dans lesquels elles ont la même organisation. Le «tronc» de ces arbres est constitué d'une fibre nucléosomique de 10 nm, et cette simple observation montre que la transcription se fait sur un ADN recouvert de nucléosomes, et non pas sur un ADN nu comme chez les Procaryotes. La longueur d'ADN transcrite représente l'**unité de transcription,** bordée par ses signaux de démarrage et de terminaison : il est possible de mesurer, en µm et en nucléotides, la longueur de telles unités.

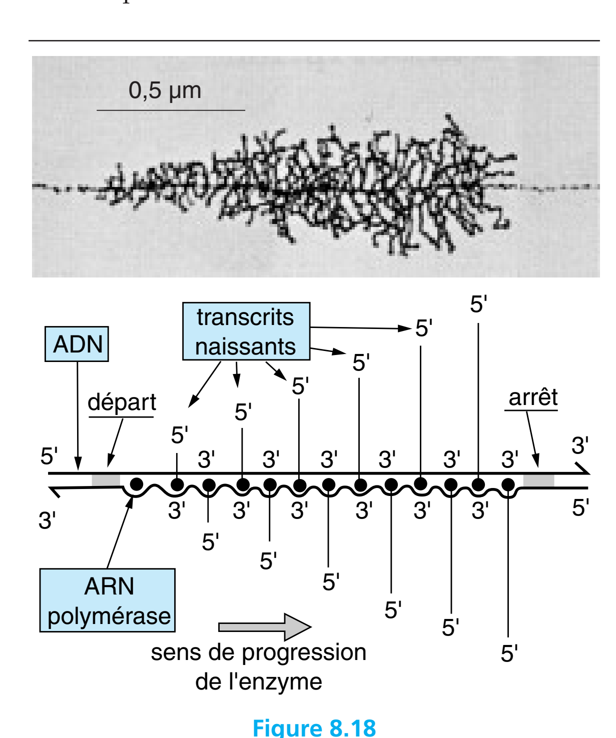


Figure 8.18

Aspect d'un complexe actif de transcription

Sur un axe d'ADN s'observent des «branches» latérales plus ou moins symétriques, de longueur croissante à partir d'une extrémité : celles-ci sont constituées par les transcrits d'ARN, d'autant plus longs qu'ils sont avancés dans leur synthèse. À la base de chacun d'eux, un globule (plus gros qu'un nucléosome) représente la molécule d'ARN polymérase et divers facteurs associés. L'extrémité flottante de la molécule est celle située du côté 5′ P de l'ARN, tandis que celle encore associée à l'ADN est l'extrémité 3′ OH.

Ce type de figure est très fréquent lorsqu'on examine des nucléoles dissociés et étalés (voir plus loin), mais pour le reste de la chromatine, ces images sont plus rares ; on observe en général des arbres incomplets, ou irréguliers, portant un nombre réduit de branches, parfois même une seule (voir *figure* 8.19). Cette diversité illustre simplement le fait signalé plus haut, à savoir que les unités de transcription sont plus ou moins activement engagées dans le processus de synthèse d'ARN. Dans les plus typiques d'entre-elles, les molécules d'ARN polymérase se touchent pratiquement le long de l'ADN, les «branches» sont nombreuses et on déduit que la transcription fonctionne à un taux maximal. Dans la majorité des cas, il semble cependant qu'une seule molécule d'ARN polymérase parcoure l'unité de transcription et termine le processus de synthèse avant qu'une autre ne recommence.

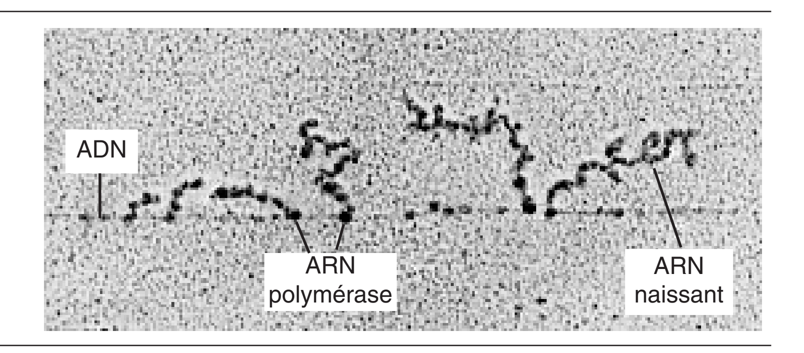
4.3.2. Conclusions tirées de l'étude cytologique

La microscopie électronique fournit deux données importantes, relativement aux mécanismes moléculaires de la transcription : 1) les transcrits apparaissent très épais et d'aspect granuleux, image que l'on n'attend pas d'une simple molécule d'ARN, même en structure secondaire, et 2) ils semblent bien plus courts que ne laisse prévoir la longueur de l'unité de transcription elle-même (il suffit de comparer la longueur maximale des branches latérales à celle du segment d'ADN transcrit). Ces deux observations sont liées : en effet, contrairement à ce qui se produit chez les Procaryotes, les ARN naissants sont immédiatement recouverts de

Figure 8.19

Représentation semi-schématique d'un gène transcrit avec une faible efficacité, et présentant seulement 6 molécules d'ARN en cours de transcription

Comparer cette figure avec la précédente. (D'après un cliché de Puvion-Dutilleul *et al.*, 1976)



protéines qui les empaquettent, les condensent et donc raccourcissent leur taille apparente.

Ces protéines sont organisées en particules d'un diamètre voisin de 20 nm, recouvrant environ 500 nucléotides d'ARN, d'une façon rappelant un peu ce qui se passe dans un nucléosome pour l'ADN. Ces grosses particules sont nommées : **particules ribonucléoprotéiques nucléaires hétérogènes** (ou PRnh), car elles sont associées aux ARN dits hétérogènes. Lorsqu'on les isole, et après avoir digéré l'ARN qui les réunit, on peut identifier et purifier une dizaine de protéines distinctes qui en constituent le cœur. Le rôle de ces particules est sans doute de protéger les ARN contre les attaques nucléasiques qui pourraient les détruire pendant la période critique où ceux-ci subissent leurs remaniements intranucléaires (la maturation). À côté de ces PRnh, il existe d'autres particules associées aux ARN naissants, de taille plus modeste mais plus solidement accrochées à leur support. C'est au sein de ces particules que l'on trouve les petits ARN nommés *sn RNA* ; le rôle de ces dernières est de participer directement aux processus de maturation de l'ARNm, qui seront développés plus loin.

Une autre remarque importante doit être faite : la taille moyenne mesurée pour les unités de transcription bien identifiables est toujours beaucoup plus longue (de 5 à 10 fois, mais parfois plus) que celle attendue d'après la taille moyenne des protéines synthétisées dans le cytoplasme (300-500 acides aminés) et des ARNm qui les codent (1 000-2 000 nucléotides). Cette observation confirme les données de la biochimie présentées plus haut, à savoir que les ARN nucléaires sont bien plus longs que ceux isolés du cytoplasme, ceci étant particulièrement vrai pour les ARNm.

5. TRANSCRIPTION DES GÈNES CODANT LES PROTÉINES (ARNm)

Les ARNm sont ceux qui portent l'information correspondant aux protéines ; ils sont le résultat de la transcription, par l'ARN polymérase II, de gènes qui ont une organisation particulière chez les Eucaryotes (succession d'exons et d'introns). Cette organisation caractéristique, dite en mosaïque, a été présentée dans le chapitre 4. Nous l'illustrerons ici au moyen de quelques exemples.

5.1. Organisation générale des gènes eucaryotiques codant les protéines (rappels)

La *figure* 8.20 montre les structures classiques des gènes de la globine et de l'ovalbumine de poulet, qui constituent les exemples historiques de la

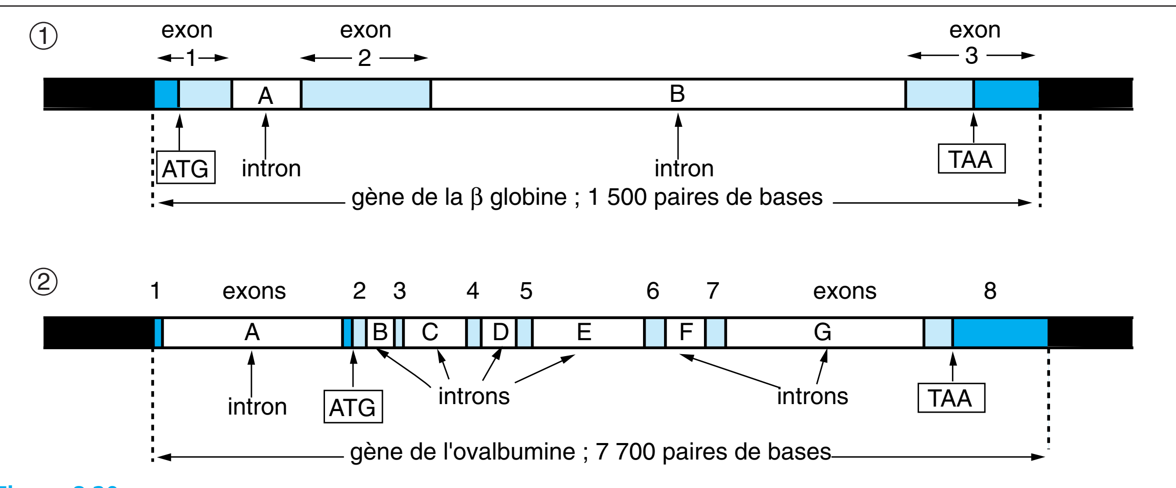


Figure 8.20

Organisation de deux gènes eucaryotiques typiques codant des protéines

(1) Gène de la β-globine de Mammifère, comprenant 3 exons (notés par des chiffres) et 2 introns (lettres). L'ARNm final, qui correspond aux seuls exons, a une longueur de 620 nucléotides et code une protéine de 146 acides aminés.
(2) Gène de l'ovalbumine de poulet, comprenant 8 exons et 7 introns. L'ARNm final, qui a une longueur de 1 872 nucléotides, code une protéine de 386 acides aminés.
Les signaux de début (ATG) et de fin de traduction (TAA) sont indiqués ; les régions des promoteurs (à gauche des schémas) ne sont pas détaillées. Les parties non codantes en 5′ et en 3′ sont figurées en rouge foncé.

mise en évidence de cette organisation en mosaïque. Celle-ci est très générale chez les gènes eucaryotiques codant les protéines. Selon les gènes, le nombre d'introns peut varier de manière très importante : on en compte 2 dans le celui de la **globine**, 7 dans le celui de l'**ovalbumine**, 36 dans celui de la **thyroglobuline** et 50 dans le celui du **collagène** ! De même, la taille de ces introns est très variable : de 80 nucléotides pour les plus petits, elle atteint 100 000 nucléotides et plus, pour les plus longs. La longueur des exons est, en revanche, beaucoup plus uniforme et correspond en général à des séquences de 40 à 50 acides aminés. Lorsqu'on examine les séquences des introns contenus dans les gènes de protéines identiques (ou homologues) chez des organismes apparentés (comme les globines, chez divers Vertébrés, par exemple) on constate qu'elles peuvent diverger considérablement, comme si ces introns n'avaient aucune fonction propre ; en revanche, les séquences des exons sont extrêmement conservées. La question de la signification biologique de ces séquences intercalées sera évoquée plus loin.

5.2. Transcription et maturation des ARN prémessagers

5.2.1. Synthèse du transcrit primaire

• Étape de **démarrage de la transcription** : grâce à l'intervention des facteurs protéiques de type FTII, l'ARN polymérase II peut opérer. Ces facteurs sont déjà fixés sur l'ADN au niveau du **promoteur**, dont l'organisation est la suivante : il s'agit d'une séquence très conservée de sept nucléotides constitués uniquement de A ou de T, située à la position -25 par rapport au premier nucléotide transcrit. On appelle ce bloc de nucléotides la «**boîte TATA**» (*TATA box*) du nom des quatre bases centrales les plus conservées chez tous les Eucaryotes ; par ses propriétés physicochimiques, cette séquence rappelle celle décrite chez les Procaryotes sous le nom de *Pribnow box*. Outre cette séquence classique et obligatoire, on observe une autre séquence promotrice, située plus en amont (position -75), qui est moins bien conservée et moins systématique : il s'agit de la «**boîte CAAT**», qui est au centre d'une succession consensus de neuf nucléotides : GG(C ou T)CAATCT. Nous verrons plus loin qu'il existe, en plus de cette séquence promotrice adjacente au gène, un deuxième type de séquences qui contrôle, chez la majorité des gènes d'Eucaryotes, le taux de transcription : il s'agit des **éléments amplificateurs**, qui peuvent multiplier par plus de 100 fois la vitesse de démarrage de ce processus.

• Étape d'**élongation** : de nombreux autres facteurs protéiques s'associent à l'ARN polymérase qui, dès lors, progresse sur le brin matrice dans le sens 3′ → 5′, tandis que l'ARN synthétisé s'allonge dans le sens 5′ → 3′.

• Étape de **terminaison** : au cours de sa progression, l'ARN polymérase rencontre à la fin du gène un signal particulier dit de **polyadénylation**. Ce signal (séquence AATAAA) conduit à la coupure enzymatique de l'ARN en cours de transcription (10 à 20 nucléotides en aval), et au démarrage d'un processus séquentiel d'accrochage d'une longue série de nucléotides AMP, qui sera décrit plus loin. La polymérase poursuit encore son chemin sur l'ADN un certain temps, et continue à transcrire un ARN qui, n'étant pas protégé par un «chapeau» (voir plus loin) est rapidement dégradé. De toute façon, l'enzyme est déjà «sortie» du gène proprement dit ; les signaux d'arrêt de la transcription effective et du décrochage de l'enzyme sont encore mal connus.

5.2.2. Maturation de l'ARN prémessager

Deux types de modification chimique affectent le transcrit primaire de manière très précoce, au sein du noyau : l'une concerne les extrémités 5′ P et 3′ OH, l'autre affecte la partie centrale de la molécule (voir *figure* 8.21).

• **Modifications des extrémités** de la molécule.

– Dès que l'extrémité 5′ P est dégagée (après la synthèse d'environ 30 nucléotides), elle subit l'addition enzymatique d'un nucléotide particulier : une guanosine-phosphate méthylée, qui constitue la **coiffe** (ou ***cap***). Tous les ARNm eucaryotiques possèdent ce chapeau, qui semble les protéger des dégradations en 5′ dues aux nucléases ; il constitue en outre un signal de reconnaissance intervenant dans la synthèse protéique, car c'est lui qui aide les ribosomes à se positionner du côté 5′ du message.

– Dès que l'extrémité 3′ OH de l'ARN est clivée (après la séquence AAUAAA), elle est prise en charge par une enzyme nommée **poly A poly-**

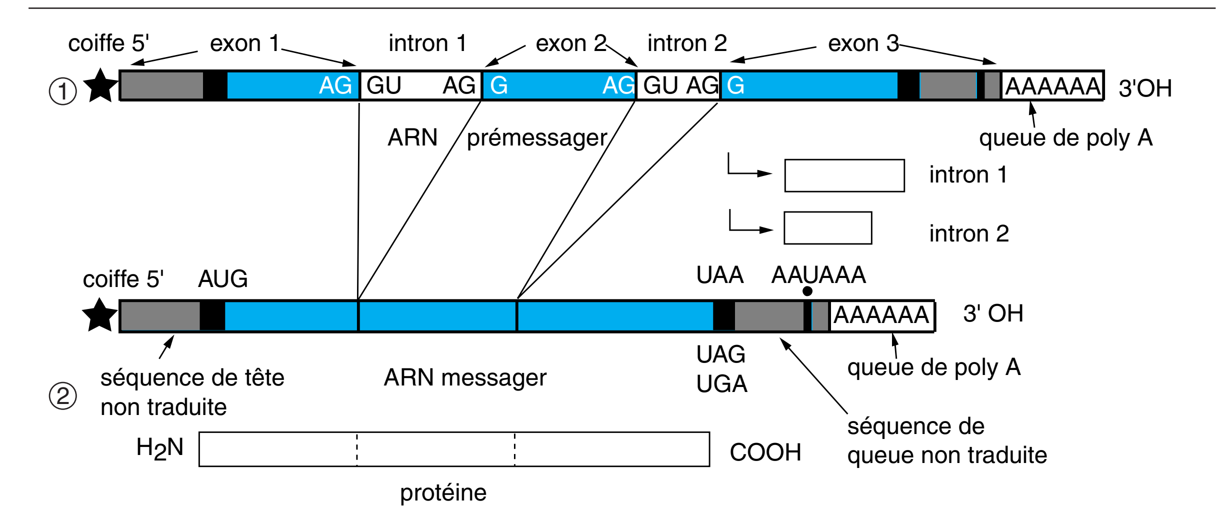


Figure 8.21

Étapes de la maturation d'un ARN prémessager eucaryotique typique

Deux types d'événements interviennent : **(1)** des modifications terminales en 5′ P (coiffe) et en 3′ OH (queue de poly A) ; **(2)** l'excision des introns et l'épissage des exons, à partir desquels la chaîne polypeptidique est fabriquée. Différents signaux (séquences consensus) sont mentionnés le long des molécules : jonctions exon/intron, polyadénylation, traduction. Comparer ce schéma avec celui de la figure 4.9.

mérase. Presque tous les ARNm des Eucaryotes possèdent une queue en 3′ OH, constituée de 150 à 200 nucléotides d'adénine (AMP), et ajoutée à la fin du transcrit de manière post-transcriptionnelle. La poly A polymérase fonctionne sans matrice et ajoute les nucléotides les uns après les autres, en utilisant l'ATP comme substrat : polyadénylation. La fonction de ce processus, absent chez les Procaryotes, reste encore mal définie : rôle dans le transport hors du noyau, protection du message en 3′, contrôle de la durée de vie de la molécule… On sait cependant que cette queue est graduellement raccourcie dès que l'ARNm entre dans le cytoplasme ; la question de la stabilité des ARNm sera évoquée plus loin.

La molécule ainsi obtenue, contenant les séquences introniques et chimiquement modifiée à ses extrémités, constitue le **transcrit primaire** et c'est elle qui va subir les étapes suivantes de la maturation. En fait, les événements d'**excision-épissage** que l'on décrira plus loin commencent à se produire dans la région 5′, avant que le transcrit complet soit terminé. Cette idée est suggérée par les images de microscopie électronique montrant des particules protéiques collées le long de l'ARN en cours de synthèse, parmi lesquelles celles intervenant sans doute dans ces processus. La présentation en deux temps des phénomènes de maturation, qui est adoptée ici, est donc arbitraire mais les événements sont ainsi plus simples à décrire.

• Processus d'**excision et d'épissage** : ils consistent à enlever successivement les séquences introniques des transcrits et à rabouter de façon précise les séquences exoniques retrouvées dans l'ARNm définitif. Ces deux phénomènes nucléaires sont responsables du raccourcissement, parfois considérable, des ARN initialement transcrits ; ils n'affectent pas les extrémités 5′ et 3′ qui restent inchangées dans les ARN nucléaires et les ARN cytoplasmiques qui en dérivent. Ces modifications internes des molécules (découvertes en 1977) étaient totalement inattendues par les chercheurs, depuis longtemps intrigués par l'intense métabolisme des ARN au sein du noyau, décrit plus haut.

L'excision et l'épissage se réalisent grâce à quatre types de particules ribonucléoprotéiques qui s'associent aux ARN prémessagers naissants, et contiennent les ***sn RNA*** signalés plus haut, ainsi qu'une dizaine de protéines chacune. Celles-ci forment les **complexes d'épissage**, qui sont un peu moins gros que des ribosomes, et réalisent les opérations en deux temps. Certaines de ces particules sont d'abord capables de reconnaître des séquences consensus spécifiques marquant la limite entre les introns et les exons (**jonctions exon-intron**). Cette reconnaissance s'effectue grâce aux ARN propres

à ces complexes, qui comportent eux-mêmes des séquences consensus complémentaires ! C'est pour cette raison qu'un nombre limité de ces particules est capable d'assurer la maturation d'une infinité – ou presque – d'ARN prémessagers. Dans un deuxième temps, après s'être associées et avoir rapproché les «pieds» des exons, et ainsi réalisé une boucle avec l'intron, ces particules soudent les exons l'un à l'autre (voir *figure* 8.22).

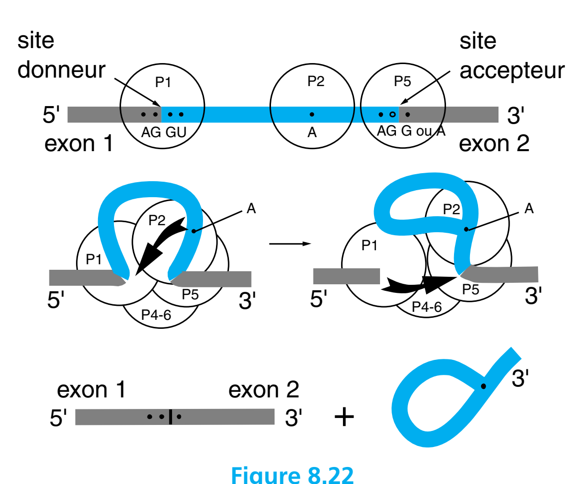


Figure 8.22

Schéma illustrant les phénomènes d'excision-épissage

Ce processus se déroule au niveau des jonctions intron-exon, grâce aux complexes d'épissage (représentés sous forme de 4 sphères) ; ils contiennent 5 ARN et plus de 50 protéines. L'intron est libéré sous une forme partiellement refermée, en forme de lasso, qui sera par la suite dégradée dans le noyau.

• **Transport des ARNm** dans le cytoplasme : celui-ci ne s'effectue que si toutes les étapes de maturation sont terminées et il semble que, jusqu'à la fin de ce processus, les ARN soient recouverts de protéines, sous la forme des particules PRnh ou des complexes d'épissage. Certaines d'entre elles sont sans doute reconnues au niveau des complexes des pores nucléaires. Étant donné le diamètre efficace de ces pores, le transport à travers eux est nécessairement de type actif, avec consommation d'énergie, à la manière de ce qui est connu pour la translocation du ribosome le long de l'ARNm ; il est suggéré que le globule central du complexe serve de transporteur. De toute manière, l'ARNm n'est vraisemblablement jamais nu, ni dans le noyau, ni dans le cytoplasme et on pense que, s'il perd ses protéines lors du passage à travers les pores, il est tout de suite pris en charge par d'autres protéines de liaison du côté cytoplasmique.

5.2.3. Remarques relatives au processus d'excision-épissage

Le mécanisme en jeu est d'une extrême précision (à la base près), car il conduit à une molécule d'ARNm mature dans laquelle la succession des nucléotides doit garder un sens (celui-ci étant inclus dans la succession des codons qui spécifient les acides aminés). Toute erreur, par addition ou suppression d'un ou deux nucléotides, induirait un décalage de phase de lecture et ferait perdre tout son sens au message, à partir de ce point ; la précision est assurée grâce à la présence des séquences consensus des jonctions exon-intron, déjà signalées. On comprend que ceci soit crucial, quand on sait que certaines protéines sont codées par des gènes contenant plusieurs dizaines d'introns, dont les séquences doivent être enlevées correctement chaque fois, au cours de la maturation du transcrit correspondant.

Dans le cas de la globine, on connaît une famille de maladies génétiques humaines conduisant à un défaut de synthèse de l'hémoglobine : les **thalassémies**, qui sont dues, entre autres raisons, à des déficiences du phénomène de maturation au niveau de ce gène. On a montré que des mutations ponctuelles (un seul nucléotide modifié) situées au niveau des introns ou des exons suffisent pour créer de nouveaux sites d'épissage ou inactiver ceux normalement présents, et conduire à la production d'ARNm anormaux. Ces génopathies, qui concernent les hémoglobines, présentent des manifestations cliniques très diverses ; selon le degré d'altération et de stabilité des hémoglobines anormales produites, elles sont plus ou moins compatibles avec une vie prolongée ; leurs causes moléculaires sont multiples (voir l'encart suivant).

Puisque les jonctions exon-intron ont des séquences conservées, on pourrait imaginer que des exons non contigus soient raboutés, ce qui serait catastrophique pour l'expression normale des gènes. Ce sont en principe les jonctions les plus proches qui sont raboutées, car les complexes d'épissage se fixent sans doute sur l'ARN à mesure que celui-ci est transcrit et se dégage de l'ARN polymérase ; de façon habituelle, il y a en fait appariement séquentiel des sites d'épissage. On découvre cependant de plus en plus d'exemples de situations normales où l'épissage ne suit pas cette règle ; les cellules contrôlent dans certains cas les processus de maturation et choisissent de rabouter tel ou tel exon non adjacents. Il est

ENCART BIOMÉDICAL

Les hémoglobinopathies : anémies falciformes et thalassémies

L'exemple le plus anciennement connu est la drépanocytose, ou anémie falciforme (en raison de l'aspect typique en faucille des hématies des malades). Cette maladie est répandue en Afrique centrale et en Asie ; les homozygotes ont une durée de vie très brève, tandis que les hétérozygotes souffrent d'anémie et d'ostéoporose. Il s'agit d'une anomalie de l'hémoglobine A (HbA), due au changement d'un nucléotide dans un gène β de globine, conduisant à la substitution d'un acide aminé (glu → val). Cette hémoglobine, notée HbS, diffère de la forme normale par sa solubilité, en particulier en présence de faibles tensions d'oxygène ; cette propriété est responsable de l'aspect caractéristique des hématies. Les hétérozygotes fabriquent les deux sortes de chaînes de globine. D'autres formes rares de drépanocytose (HbC, HbE) sont connues, dues aussi à un seul changement d'acide aminé dans la chaîne β ou dans les chaînes α.

Les thalassémies sont caractérisées par une synthèse anormale des chaînes d'hémoglobine ; elles portent ce nom car elles sont très répandues tout autour de la Méditerranée, dans le Moyen et l'Extrême-Orient, et en Inde. Plus d'une centaine de mutations ont été identifiées. Les homozygotes présentent des troubles graves, souvent mortels, avec anémie sévère, troubles osseux et splénomégalie. On distingue les β-thalassémies, où les chaînes β absentes ou anormales sont remplacées par des chaînes delta, et les α-thalassémies, où les chaînes β remplacent les chaînes α. Les causes moléculaires des thalassémies sont très variées : mutations ponctuelles ou délétions, touchant les gènes de globine ou pas. Des mutations situées dans les promoteurs empêchent toute synthèse d'ARNm, d'autres touchant les sites d'épissage sont responsables de la formation d'ARNm anormaux (par élimination ou addition d'exons), et donc de protéines anormales. De grandes délétions touchant les loci des familles des gènes α ou β de globine éliminent plusieurs gènes à la fois, entraînant des conséquences souvent graves. Enfin, des délétions situées à l'extérieur de ces loci modifient l'état de la chromatine et inactivent des gènes pourtant normaux.

possible, de cette façon, de fabriquer des protéines différentes à partir d'un seul gène au départ : c'est ce qu'on appelle l'**épissage alternatif** (voir plus loin). Ce processus intervient dans les phénomènes de différenciation cellulaire : un seul gène est utilisé à des fins différentes suivant le tissu considéré, où il a une expression spécifique. Les mécanismes précis contrôlant l'épissage alternatif restent encore mal compris.

La question de la quantité d'**ADN informatif** dans les génomes d'Eucaryotes a été évoquée dans le chapitre 4. Connaissant la structure des gènes chez ces organismes, et sachant qu'il existe de très longues séquences d'ADN non transcrites, les séparant, on comprend mieux pourquoi seule une part infime (quelques %) du génome est génétiquement «utile». La *figure* 8.23 schématise l'organisation d'un segment représentatif de chromosome eucaryotique et montre la taille des gènes, le nombre d'introns qu'ils contiennent, ainsi que la taille de l'ARNm correspondant. On voit bien la différence entre cette organisation et celle des gènes procaryotiques, vue plus haut.

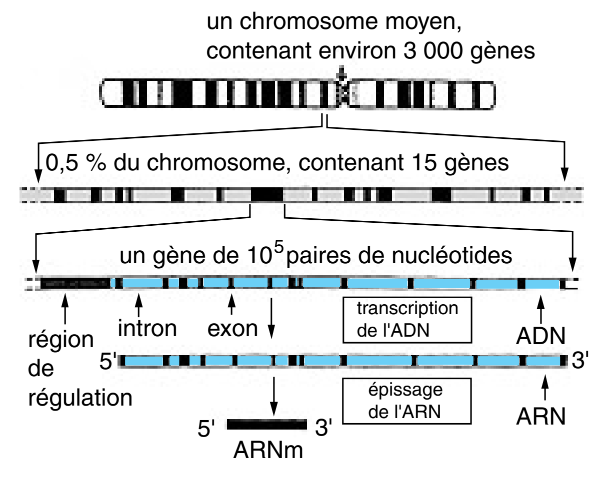


Figure 8.23

Organisation d'un segment de chromosome eucaryotique typique

Cette figure montre que la quantité d'ADN informatif est, en raison de la longueur des séquences intergéniques et des introns, très peu importante par rapport à sa longueur totale.
L'exemple choisi est celui du chromosome X humain, dont la taille représente environ $1{,}5.10^8$ paires de nucléotides ; les 15 gènes représentés et leur organisation sont théoriques.

Commentaire

L'hypothèse du brassage des exons

On peut s'interroger sur la signification évolutive d'un mécanisme aussi complexe et représentant, d'une certaine manière, un risque pour les cellules. L'hypothèse actuellement retenue sur le rôle des introns dans les gènes d'Eucaryotes est la suivante : en constituant des zones « sans importance » du point de vue du message génétique lui-même, entre les exons, ils permettraient un brassage de ceux-ci par les phénomènes de recombinaison génétique liés à la reproduction sexuée. Le **brassage des exons** semble être en effet responsable de l'apparition de nombreuses protéines complexes qu'on trouve chez les organismes supérieurs. Ces protéines composites (ou « mosaïques ») sont constituées de différents domaines, ou modules, correspondant à des exons, que l'on retrouve dans d'autres protéines n'ayant rien à voir fonctionnellement avec elles ! Grâce à ce mécanisme, l'évolution « emprunte » des exons un peu partout dans le génome, les réassocie au hasard pour fabriquer une panoplie de gènes (et de protéines) divers, qui seront testés au cours du temps par la sélection naturelle. Les introns faciliteraient ainsi la mobilité des exons dans le génome et augmenteraient les capacités évolutives des organismes. Le prix à payer pour ceci serait la fabrication de transcrits géants, sans rapport avec le produit final, et donc une dépense importante de matière et d'énergie par les cellules.

6. TRANSCRIPTION DES GÈNES CODANT LES ARNr. ÉDIFICATION DES RIBOSOMES AU SEIN DU NUCLÉOLE

6.1. Organisation des gènes ribosomiques

Les gènes de protéines, même abondantes, ne sont présents, en général, qu'en une seule copie par génome haploïde ; ceux des ARN dits de structure : ARNr et ARNt, sont en revanche présents en un grand nombre d'exemplaires (**gènes répétés** ou **redondants** ; voir chapitre 4), car ils ne font pas l'objet d'un phénomène d'amplification de l'information, comme cela existe dans le cas de la synthèse protéique : un seul ARNm fabrique jusqu'à dix molécules de la même protéine par minute, et sa durée de vie peut être de plusieurs heures. Une cellule eucaryotique moyenne contient 10^7 ribosomes et elle doit, au minimum (sans tenir compte du renouvellement), fabriquer autant de copies de chacun des ARNr qui les constituent à chaque génération, éventuellement en quelques heures (24 h pour un fibroblaste) ; le problème est identique pour les ARNt. On compte chez l'Homme 200 copies identiques ou très voisines de gènes pour les ARNr, regroupées en paquets au niveau des télomères de cinq chromosomes différents (n° 13, 14, 15, 21 et 22). Chez le xénope (un Amphibien), on a identifié environ 500 copies sur un même endroit d'un seul chromosome. Ces endroits sont nommés **organisateurs nucléolaires**, car les nucléoles s'organisent autour de ces segments précis d'ADN (voir plus loin).

Un gène ribosomique est constitué de plusieurs segments contigus dont certains sont à l'origine d'ARN « utiles », et d'autres ne le sont pas (et dont les produits seront dégradés après transcription). Chaque unité de transcription comprend de 8 à 13 000 nucléotides selon l'organisme, mais on peut aussi observer de légères variations au sein des différentes copies d'un même organisme ; ces variations portent sur les régions non utiles car elles ne sont pas soumises à une contrainte de structure, comme le sont les autres. Deux gènes sont séparés par une région non transcrite, dite **espaceur**, ou intercalaire non transcrit, qui contient les promoteurs (ainsi que des signaux de régulation) et dont la longueur est aussi très variable ; l'ensemble des deux régions constitue une **unité de répétition** (voir *figure* 8.24).

Les unités de répétition sont disposées en tandem direct (tête-queue) le long de l'ADN et donnent, lorsqu'on les observe en microscopie électronique (selon les techniques décrites plus haut pour la chromatine), des figures très spectaculaires de successions d'un grand nombre d'arbres de Noël. Les complexes de transcription ainsi visualisés fonctionnent très activement car il peut y avoir jusqu'à 100 transcrits sur le même gène. Les molécules d'ARN polymérase, au pied de chaque transcrit, se touchent les unes les autres et toutes les unités de transcription fonctionnent simultanément. Le schéma du fonctionnement d'une unité de répétition a été donné dans la *figure* 8.18.

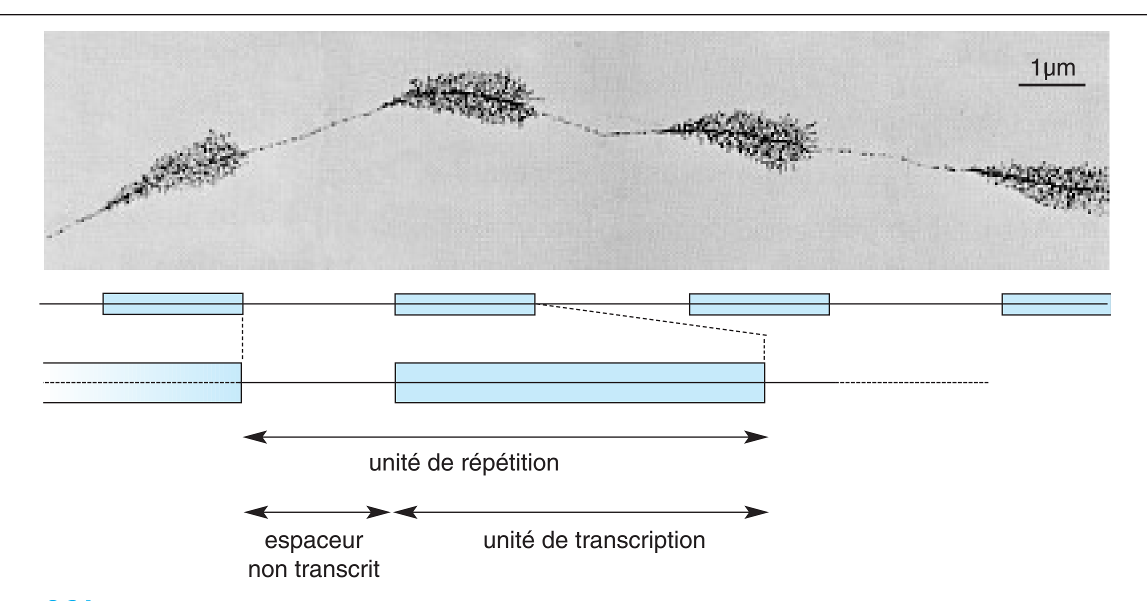


Figure 8.24

Transcription des gènes codant les ARNr au niveau d'un court segment d'organisateur nucléolaire

Quatre unités de répétition, disposées en « tandem direct » (avec la même polarité), sont représentées. Chacune d'elles est formée d'une zone non transcrite et d'une unité de transcription qui est à l'origine d'un « arbre de noël » typique, dont le fonctionnement est décrit dans la figure 8.18.

6.2. Transcription et maturation des ARN ribosomiques

Comme pour les ARNm, il y a, ici aussi, synthèse d'un grand ARN précurseur subissant de nombreuses modifications avant de donner les produits finaux (voir *figure* 8.25). Grâce à des facteurs de transcription appropriés, l'ARN polymérase I reconnaît le promoteur du gène, situé dans le segment intergénique non transcrit, puis elle fabrique une longue molécule qui est progressivement recouverte de protéines, dont on verra les fonctions plus loin. Tous les commentaires faits au sujet des ARNm, sur les observations en microscopie électronique, sont valables ici aussi. Le **transcrit primaire** a un coefficient de sédimentation voisin de 45 S ; des expériences de type *pulse-chase* ont permis de comprendre comment s'effectue la maturation de cette molécule. Celle-ci est successivement découpée en morceaux dont seuls subsistent trois ARNr retrouvés dans les ribosomes cytoplasmiques (28 S, 18 S, 5,8 S). Le découpage se fait en plusieurs étapes ordonnées qui font apparaître des ARN de longueurs diverses : ce sont les intermédiaires de maturation, dont les tailles ont été données dans la *figure* 8.17. L'ensemble de ces molécules constitue, en fait, la population des ARN nucléolaires dont on a parlé plus haut ; comme le nombre des espèces différentes est relativement limité, on obtient une bonne résolution des pics dans les électrophorèses ou les centrifugations.

Contrairement à ce qui se passe pour les ARNm, l'excision n'est jamais suivie ici de raboutage des morceaux séparés ; les phénomènes en jeu sont beaucoup plus simples : il s'agit soit de dégradation complète de certains segments « inutiles », soit de dégradations partielles terminales, en 5′ P ou en 3′ OH, pour donner la taille définitive des molécules. Les trois espèces moléculaires intéressantes sont ainsi produites dans des proportions équimoléculaires (1,1,1), qui sont celles trouvées dans les ribosomes. Ceci constitue une façon simple de réguler la transcription d'une population de molécules, à la manière d'un opéron bactérien.

6.3. Couplage de la maturation des ARNr et de l'élaboration des sous-unités ribosomiques. Les préribosomes

La synthèse et la maturation des ARNr ne sont pas indépendantes de la fabrication des sous-unités ribosomiques elles-mêmes ; ces processus sont en fait hautement intégrés et se déroulent au sein du nucléole. À mesure que le transcrit primaire est

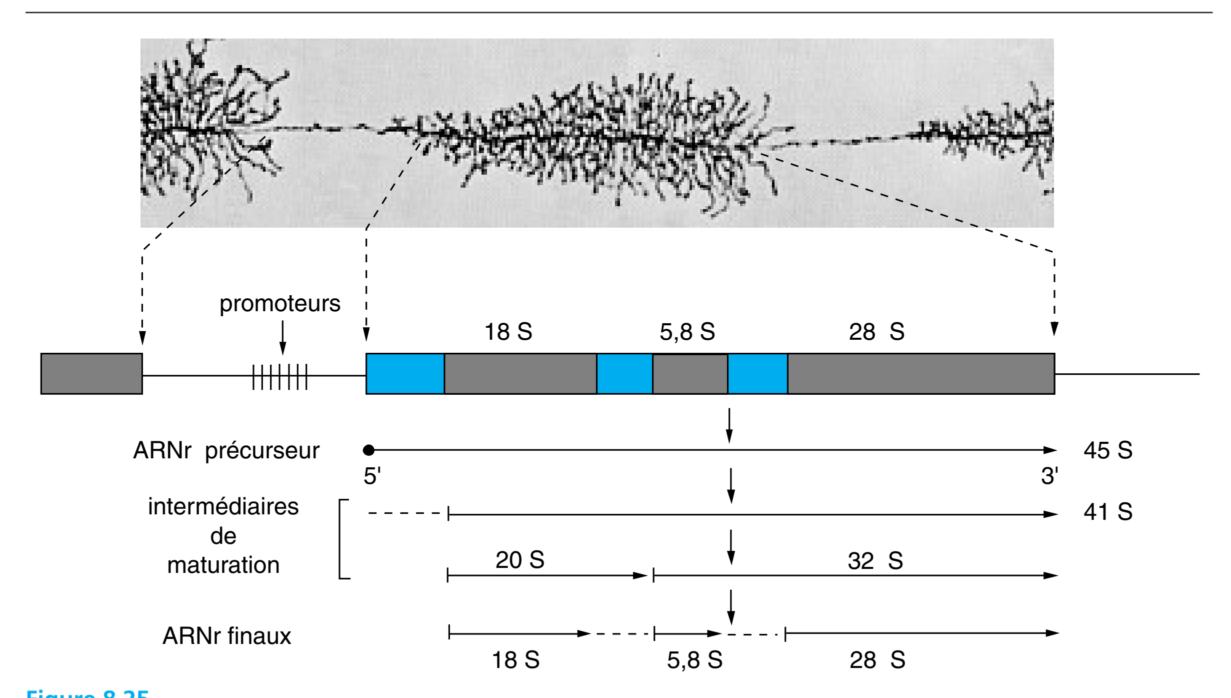


Figure 8.25

Transcription et maturation des ARNr

Un grand précurseur (ARNr 45 S) est fabriqué sur chaque unité de répétition ; celui-ci est ensuite découpé en segments successifs (41 S, 32 S et 20 S) faisant l'objet de digestions terminales en 3′ ou en 5′ (les segments perdus sont nommés espaceurs). Les ARNr 18 S, 5,8 S et 28 S sont les produits finaux de la maturation, qui se déroule au sein des préribosomes.

élaboré, des protéines (importées du cytoplasme) viennent se fixer dessus et contribuent à le compacter et à raccourcir sa longueur apparente ; celles-ci sont de nature double : 1) les protéines ribosomiques de structure, c'est-à-dire celles trouvées dans les ribosomes eux-mêmes, et 2) des protéines intervenant directement dans les processus de maturation. Ce sont ces dernières qui clivent l'ARN de façon précise et raccourcissent les molécules obtenues pour donner les transcrits 28 S, 18 S, 5,8 S (certaines d'entre elles sont associées à des petits ARN de type *snRNA*).

On considère qu'au total, une centaine de protéines différentes pourraient s'associer à l'ARNr, au sein du nucléole. L'énorme particule ainsi constituée, plus grosse qu'un ribosome, s'appelle un **préribosome** ; c'est à l'intérieur de celle-ci que se réalisent en même temps la maturation de l'ARN précurseur 45 S, la mise en place et la ségrégation des composants des deux sous-unités ribosomiques (voir *figure* 8.26). Il faut enfin signaler qu'un ARN supplémentaire, non codé dans l'unité de transcription venant d'être étudiée, doit prendre sa place dans le préribosome : il s'agit de l'ARNr 5 S, inclus dans la grosse sous-unité. Ce petit ARN est codé à un tout autre endroit du génome, au niveau de gènes répétés en plusieurs milliers d'exemplaires. Tous ces événements demandent un certain temps, et on considère qu'il faut près d'une heure pour que les sous-unités soient complètement terminées ; c'est seulement à ce moment là qu'elles peuvent quitter le nucléole, lieu de leur élaboration, et enfin sortir du noyau.

6.4. Rapports structure-fonction au sein du nucléole

L'ultrastructure du nucléole a été décrite au début de ce chapitre ; son organisation complexe est assez facilement mise en rapport avec les phénomènes moléculaires qu'on vient de présenter :

– le centre fibrillaire est constitué de chromatine diffuse non transcrite, appartenant à l'organisateur nucléolaire ou à des régions voisines ;

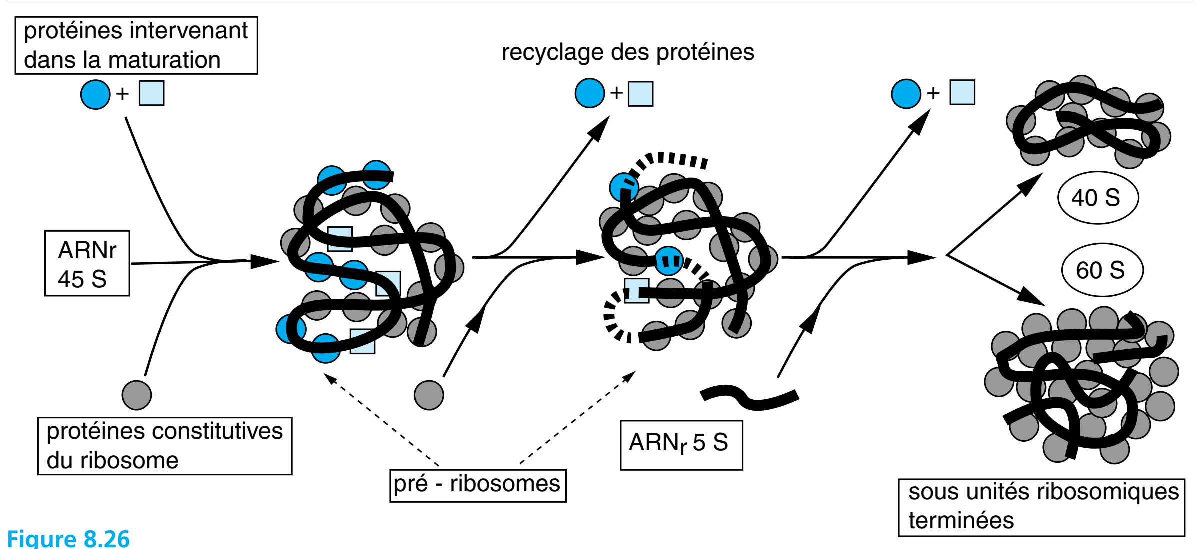


Figure 8.26

Étapes de la fabrication d'un ribosome à partir du précurseur ARNr 45 S

Diverses protéines enzymatiques ou de structure se fixent à l'ARN et participent à sa maturation (découpage et digestion en 3' ou en 5') et à son assemblage. Les complexes enzymatiques sont progressivement exclus des sous-unités ribosomiques au cours de leur élaboration, et sont recyclés pour fabriquer d'autres ribosomes. Parmi la centaine de protéines constituant les préribosomes, plus de 80 sont en fait des protéines ribosomiques (voir *figure* 4.14).

– la zone fibrillaire dense est constituée d'ADN activement transcrit (sous forme de longues boucles appartenant éventuellement aux organisateurs nucléolaires de différents chromosomes), ainsi que des molécules d'ARNr naissantes, encore peu recouvertes de protéines et peu compactées ; elle correspond aux nombreux arbres de Noël décrits plus haut ;

– la zone granulaire est constituée de préribosomes en cours de maturation, ainsi que de sous-unités ribosomiques terminées et prêtes à être exportées vers le cytoplasme.

Les noyaux contiennent en général un ou deux nucléoles, rarement plus. Cette observation pose un problème car, dans toute cellule diploïde, il existe au minimum deux organisateurs nucléolaires (un par chromosome homologue) et le plus souvent, bien plus (mais toujours un nombre pair) : chez l'Homme, qui possède cinq organisateurs dans son génome haploïde, on devrait observer dix nucléoles par noyau. En fait, il existe un phénomène de rapprochement des organisateurs nucléolaires et de fusion des différents nucléoles en un seul, de grande taille et de structure compacte ; l'origine de ce fait n'est pas connue. Compte tenu de ce qui vient d'être dit sur le rôle du nucléole, il n'est pas étonnant d'observer des variations importantes de son organisation et de son volume, selon le degré de l'activité cellulaire. En ce qui concerne les variations de volume, le composant granulaire est le plus sensible car la transcription proprement dite peut, dans une certaine mesure, être découplée de l'élaboration des particules. La disparition complète du nucléole au début de la mitose est expliquée par la condensation, et donc l'inactivation, de la chromatine des organisateurs nucléolaires.

7. ÉLÉMENTS DE CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DES GÈNES CHEZ LES EUCARYOTES

Le principe et certains mécanismes responsables du contrôle de l'expression des gènes ont été décrits dans le chapitre 4, en prenant comme exemple les Procaryotes, pour lesquels les choses sont simples. Chez les Eucaryotes, celles-ci sont bien plus compliquées en raison, d'une part, de la taille considérable de leurs génomes et, d'autre part, de la différenciation cellulaire accompagnant

la pluricellularité, et qui est la règle pour la plupart d'entre eux. À côté d'un contrôle à court terme et réversible de l'activité de certains gènes, semblable à celui déjà décrit chez les Bactéries, il existe chez les Eucaryotes pluricellulaires des mécanismes d'activation et de répression géniques stables, qui doivent permettre de comprendre l'origine des différents types cellulaires spécialisés au cours du développement embryonnaire.

7.1. Expression différentielle du génome dans les cellules des organismes complexes

7.1.1. Notions de détermination et de différenciation à l'échelle moléculaire et cellulaire

Les caractéristiques morphologiques, biochimiques et fonctionnelles des cellules différenciées dépendent entièrement des protéines qui les constituent. Le génome humain, par exemple, code potentiellement environ 5.10^4 chaînes polypeptidiques, mais on admet que de nombreuses cellules spécialisées n'en fabriquent, à un moment donné, que 5 à 10 000 différentes. Parmi celles-ci, il faut distinguer : 1) les protéines rencontrées dans tous les types cellulaires, en général des enzymes du métabolisme énergétique ou intermédiaire de base : glycolyse, cycle de Krebs, synthèse des acides aminés… (**enzymes de ménage**, ou domestiques), ou bien des protéines entrant dans la constitution de structures universelles (ribosomes, cytosquelette, membranes…), et 2) les protéines spécialisées, souvent en nombre limité et parfois très abondantes, caractéristiques d'une différenciation donnée (protéines dites **tissu-spécifiques** : l'hémoglobine des hématies, par exemple). Les divers aspects de ce phénotype, appelé **différenciation terminale**, seront analysés dans le chapitre 13.

L'apparition des différentes catégories de cellules au cours du développement embryonnaire, alors que seules des mitoses assurent leur prolifération, implique un premier type d'événement, appelé **détermination** ; il s'agit d'un engagement progressif du matériel génétique de certaines lignées cellulaires dans le sens d'une spécialisation physiologique donnée, sans que celle-ci se manifeste encore. L'activation de gènes spécifiques et la répression d'un grand nombre d'autres, selon des modalités propres à chacun des types de cellules, conduit à une expression différentielle du génome. Nous décrirons brièvement plus loin quelques mécanismes de contrôle de l'expression des gènes chez les Eucaryotes ; de façon générale, il s'agit d'un processus d'une grande complexité, et qui commence à peine à être compris.

7.1.2. Constance du contenu génétique de tous les noyaux

Les différences existant entre les diverses cellules d'un organisme supérieur sont parfois tellement importantes qu'il était admis, jusqu'à la fin du siècle dernier, que la spécialisation cellulaire était liée à la perte de tous les « déterminants génétiques » non nécessaires à la réalisation des fonctions physiologiques particulières assurées par les cellules. Depuis les années 50, de nombreuses expériences ont montré que cette idée d'une modification irréversible de la nature et de la quantité du matériel génétique était erronée (aux exceptions près que nous verrons plus loin).

• Des mesures biochimiques de plus en plus fines ont permis d'établir que la quantité d'ADN est constante dans tous les noyaux des cellules somatiques de l'organisme, quel que soit leur degré de différenciation (à l'exclusion des cas de polyploïdie, très fréquents chez les Végétaux). Ces données sont confirmées par la cytologie et l'analyse fine des chromosomes, dont les profils de bandes sont identiques dans toutes les cellules.

• Des expériences de transplantations nucléaires chez les Amphibiens (voir encart suivant) ou de régénération de plantes entières à partir de cellules déjà spécialisées (voir chapitre 13) démontrent l'équivalence génétique et la totipotentialité des noyaux de cellules différenciées.

• Les données de la biologie moléculaire, avec les résultats concernant le clonage et le séquençage des gènes, ainsi que l'utilisation de sondes nucléiques appliquées à divers types cellulaires, établissent de façon définitive l'identité des séquences des molécules d'ADN contenues dans leurs noyaux.

Il faut souligner que ces travaux mettent uniquement en évidence la totipotentialité des noyaux des cellules animales, à la différence de ce qui est obtenu chez les Végétaux, où la totipotentialité des cellules elles-mêmes, à travers la régénération de

Encart historique

Les transplantations nucléaires chez les Amphibiens

Le principe de ces expériences célèbres, menées par Briggs et King (1957), puis Gurdon (1962), consiste à substituer au noyau totipotent de l'œuf, des noyaux issus de cellules plus ou moins différenciées, et de tester ainsi les capacités informatives de ces derniers en suivant le devenir de ces cellules-chimères. Des noyaux purifiés sont injectés, à l'aide d'une micropipette de verre, à des œufs non fécondés qui ont été auparavant énucléés par irradiation aux rayons UV. Lorsque ces noyaux sont issus de blastulas ou de gastrulas jeunes, on obtient des individus adultes et normalement constitués ; la totipotence est ici démontrée sans aucune ambiguïté. Ces expériences constituent en fait les premières opérations de clonage chez des Vertébrés (les noyaux provenant d'un même individu au départ).

Lorsqu'on utilise des noyaux issus de cellules somatiques d'individus adultes, on constate qu'ils peuvent conduire à l'obtention de larves plus ou moins avancées, et avec des fréquences d'autant plus faibles que les cellules de départ sont plus âgées et très différenciées. Si l'on part, par exemple, de cellules de type intestinal ou de kératinocytes en culture, on obtient des têtards bien conformés, capables de nager et avec des tissus normaux, mais jamais d'adultes. Malgré cette réserve, et le fait que ces expériences n'ont pu être conduites que sur un petit nombre d'espèces favorables, la réponse semble néanmoins claire en ce qui concerne la conservation de l'intégralité du génome au cours de la différenciation cellulaire.

plantes entières, est couramment démontrée ; cette observation sera discutée dans le chapitre 13.

7.1.3. Rôle du cytoplasme dans le contrôle des activités nucléaires

Des expériences déjà anciennes de transplantation nucléaire chez les Amphibiens ont montré que le cytoplasme a un rôle important à jouer dans le maintien des activités propres au noyau et qu'il exerce ainsi un contrôle en retour pouvant rendre compte de la stabilité d'un état différencié donné. Les noyaux de cerveau de grenouille adulte ont une chromatine très condensée, fabriquent peu d'ARN et ne répliquent pas leur ADN. Lorsqu'ils sont purifiés et injectés dans divers types de cellules de type ovocyte ou œuf, on obtient les résultats suivants. Si la cellule receveuse est un :

– gros ovocyte en croissance, qui ne synthétise pas d'ADN mais fabrique en abondance des ARNr, les noyaux injectés grossissent, leur chromatine se décondense, des nucléoles apparaissent et une abondante synthèse d'ARN est détectable par autoradiographie, après quelques heures ;
– gros ovocyte en train de subir la méiose, ne fabriquant ni ARN ni ADN, mais montrant des chromosomes condensés, les noyaux injectés donnent naissance à des chromosomes qui se placent sur des fuseaux de division typiques ; il n'y a ni synthèse d'ADN ni d'ARN ;
– œuf pondu non fécondé, qui s'apprête à répliquer son ADN, les noyaux injectés grossissent et synthétisent de l'ADN mais pas d'ARN ; les nucléoles n'apparaissent pas.

Ces expériences démontrent que divers facteurs, sans doute protéiques, sont présents dans le cytoplasme, et qu'ils doivent pouvoir entrer dans les noyaux pour moduler de façon rapide leur activité. La structure et le mode d'action de ces facteurs sont maintenant connus, comme on le verra plus loin.

7.1.4. Modulation de l'expression des gènes : l'exemple type d'une hormone stéroïde

Il ne s'agit pas ici d'étudier de façon exhaustive le mode d'action des hormones stéroïdes, mais de montrer avec cet exemple quel a été l'apport spécifique de la biologie cellulaire à la résolution de cette question. Le spectre d'activité des bandes des chromosomes polyténiques est susceptible d'une régulation à court terme, partiellement réversible, qui est contrôlée par des facteurs physiques ou chimiques. Chez la drosophile, des modifications spécifiques du profil chromosomique peuvent être induites, *in vivo* ou *in vitro*, par une hormone stéroïde : l'ecdysone (l'hormone de mue des Insectes). Son taux varie périodiquement au cours du développement larvaire et induit la transcription de gènes spécifiques, dont les produits sont nécessaires au déroulement de chaque stade. Lors de la pupaison, en particulier, on observe un très bel exemple d'activation séquentielle de *puffs*.

L'injection d'hormone à une larve, ou bien l'ajout de celle-ci à des glandes salivaires disséquées, *in vitro*, induit l'apparition de 6 *puffs* caractéristiques après 5-10 minutes. Ces structures atteignent leur développement maximal après 4 heures, puis régressent spontanément ; ce sont les ***puffs* précoces**. Après un temps de latence d'environ 3 heures, un autre groupe de 120 puffs apparaît, selon une chronologie bien définie (***puffs* tardifs**). Ces deux types de *puffs* n'ont pas le même comportement vis-à-vis de divers facteurs : dose d'hormone, durée du traitement, présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique… ; de plus, la mise en route des premiers est graduelle et réversible *in vitro*, tandis que celle des seconds est de type « tout ou rien » et irréversible. La conclusion de ces expériences est que les *puffs* précoces, après activation directe par l'hormone (liée à un récepteur, comme on le verra plus loin), synthétisent diverses protéines, dont certaines induisent la mise en route des *puffs* tardifs, et d'autres inhibent enfin le fonctionnement des premiers.

Ce type de contrôle de l'expression de gènes s'effectue en deux temps ; il est enclenché par une molécule simple et s'accompagne de phénomènes en cascade d'amplification et de complexification de la réponse, mettant en jeu des protéines régulatrices. Ces processus sont ici directement visibles, ce qui donne tout son intérêt à ce modèle biologique. Ce mécanisme peut en fait servir de prototype à un grand nombre de réponses hormonales chez les Animaux ou les Végétaux. Il faut noter que des facteurs tels que la chaleur (passage de 25 à 37° pendant 30 minutes), certains sucres simples, des vitamines ou des ions métalliques ont des effets semblables à celui de l'ecdysone ; les causes moléculaires de ces différentes réponses ne sont pas toujours identifiées et leur diversité témoigne de la complexité des phénomènes en jeu.

7.2. Mécanismes moléculaires du contrôle de l'expression des gènes

7.2.1. Niveaux de contrôle de l'expression des gènes

Le schéma de la *figure* 8.27 présente de façon simplifiée la cascade des événements intervenant dans l'expression du génome chez les Eucaryotes ; nous verrons que chaque étape de cette cascade peut faire l'objet d'un contrôle séparé. Mis à part quelques rares exemples de modification du matériel génétique, l'expression des gènes est contrôlée au niveau transcriptionnel ou traductionnel. Comme chez les Procaryotes, le mécanisme le plus important consiste à activer ou réprimer certains gènes, soit de façon réversible et transitoire (contrôle hormonal, par exemple), soit de manière définitive dans le cadre de la différenciation cellulaire. Nous verrons plus loin comment des protéines particulières, appelées **facteurs de transcription**, capables de se lier à de courtes séquences spécifiques d'ADN souvent très conservées au plan évolutif, permettent cette régulation. Il s'agit d'un domaine d'une grande complexité car de très nombreux facteurs de ce type existent,

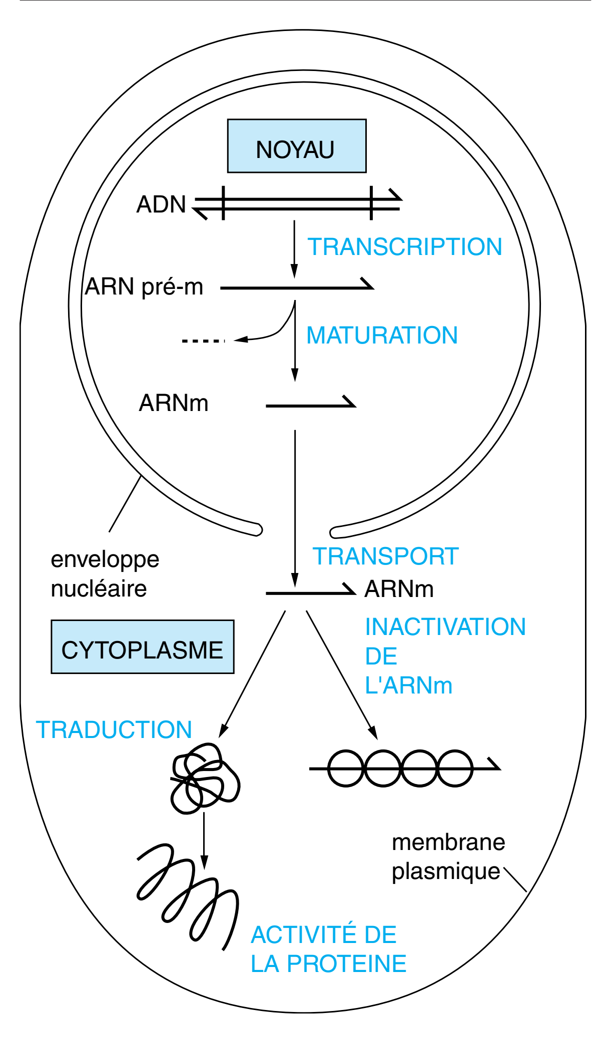


Figure 8.27
Cascade des événements intervenant dans l'expression des gènes de protéines chez les Eucaryotes
Chacune des 6 étapes est susceptible de faire l'objet d'un contrôle.

dont les modes d'action sont différents les uns des autres, et qui agissent le plus souvent en concertation selon des combinaisons variées.

Il apparaît, par exemple, qu'une seule de ces protéines peut se fixer en différents endroits du génome et contrôler plusieurs gènes à la fois ; ceci permet d'expliquer qu'une différenciation donnée puisse correspondre à l'activation coordonnée de tout un lot de gènes précis. Par ailleurs, on montre qu'un seul gène est en général contrôlé simultanément par plusieurs sites activateurs ou inhibiteurs, plus ou moins proches, sur lesquels se fixent diverses protéines régulatrices. Une telle stratégie évite aux organismes de produire un facteur spécifique pour chacun des milliers de gènes actifs dans leurs cellules ; en effet, si un gène peut être activé par trois protéines *a*, *b* et *c*, un autre peut n'être activé que par *a* et *b*, et un troisième par *b* et *c*. La combinaison d'un nombre limité de protéines régulatrices peut ainsi rendre compte du contrôle d'un très grand nombre de gènes indépendants. Chaque type de cellule contient ainsi un mélange spécifique de protéines régulatrices, agissant en association pour déterminer l'expression de différents gènes.

7.2.2. Élimination, modification ou amplification de gènes

• Au cours du développement de l'ascaris et de certains Insectes, un phénomène très rare d'élimination de chromosomes dans les cellules embryonnaires a été mis en évidence ; celui-ci, nommé **diminution chromatique**, est en rapport direct avec un type bien particulier de différenciation. Chez l'ascaris, le zygote possède deux (ou quatre, selon les espèces) très gros chromosomes ; lors de la première division de l'embryon, seule une cellule conserve ces deux gros chromosomes ; dans l'autre cellule, les chromosomes se fragmentent en morceaux, dont certains sont éliminés et ne se retrouveront pas dans les noyaux frères de la division suivante. Le phénomène se reproduit au cours des divisions suivantes, de sorte que deux lignées cellulaires sont rapidement établies : l'une qui comporte les gros chromosomes caractéristiques de l'œuf, l'autre qui comporte de nombreux petits chromosomes. Des expériences de destruction de blastomères démontrent que ces deux lignées correspondent respectivement à la lignée germinale et à la lignée somatique. Des analyses de biologie moléculaire ont prouvé que le matériel chromosomique éliminé est constitué de séquences d'ADN hautement répétées dont la fonction n'est pas connue, bien qu'elles soient indispensables à l'établissement de la lignée germinale.

• La grande diversité des anticorps produits par les différents clones de lymphocytes est en partie expliquée par le fait que ces cellules ne possèdent pas la même information génétique au niveau des gènes codant les immunoglobulines. Au cours de leur différenciation, il se produit des réarrangements chromosomiques très locaux, consistant dans la mise en contact et la soudure de segments répétés d'ADN de différents types, portés par un même chromosome, et au départ éloignés les uns des autres. Ces phénomènes uniques de **recombinaison intrachromosomique**, qui sont d'une grande complexité, ne peuvent pas être détaillés plus avant.

• Un phénomène d'**amplification des gènes ribosomiques** a été mis en évidence dans les ovocytes d'un grand nombre d'Animaux. L'exemple le plus connu est celui du xénope (un Amphibien), chez qui le génome haploïde normal comprend environ 500 copies identiques ou très voisines de ces gènes, disposées en un seul ensemble (voir plus haut). Dans les ovocytes de cet organisme, on a montré qu'il existe en fait deux millions de copies de ces gènes. Cet accroissement d'un facteur 2 000 par rapport aux cellules somatiques est dû au fait que ce type de cellules produit, au cours de sa différenciation, des copies extrachromosomiques de ces gènes. Celles-ci se présentent sous forme de molécules circulaires contenant un nombre variable de gènes ; autour de chacune d'elles s'organise un petit nucléole, comme c'est le cas habituel, mais indépendant de tout chromosome (on en compte ainsi 1 000-1 500 par noyau).

Ce phénomène unique est mis en rapport avec un besoin considérable en ARNr, pour construire un très grand nombre de ribosomes, en un temps court ; il se produit pendant une phase d'accroissement cellulaire intense, située au début de la période vitellogénique typique de ces cellules. L'amplification reste un mécanisme exceptionnel, et en dehors de quelques exemples normaux ou pathologiques, on montre que le nombre de copies des gènes de protéines est le même dans tous les tissus d'un organisme donné, qu'il soient ou non spécialisés dans la production abondante de protéines spécifiques. Ceci prouve bien que le contrôle majeur de l'expression des gènes s'exerce au niveau transcriptionnel ou traductionnel.

7.2.3. Organisation générale de la chromatine. Rôle des histones

Des expériences faites sur des noyaux purifiés par fractionnement cellulaire montrent qu'ils contiennent deux types de chromatine, différant vis-à-vis de leur sensibilité à l'action d'une ADNase très diluée mise dans le milieu d'incubation ; 10 % environ de la chromatine est particulièrement sensible à la digestion par cette enzyme. Lorsqu'on analyse des tissus différents, connus pour exprimer des catalogues de protéines distincts, on observe que ce ne sont pas les mêmes régions du génome qui sont préférentiellement dégradées. L'utilisation de sondes d'ADN correspondant à des gènes précis montre en effet que ce sont les gènes activement transcrits dans certains types cellulaires qui appartiennent à ces régions sensibles. De cette sensibilité à l'ADNase, liée à une plus grande accessibilité de l'ADN, on conclut que la chromatine contenant des gènes actifs est localement dans un état déroulé, despiralisé, qui est celui observé dans l'euchromatine. Les nucléosomes seraient absents à ce niveau, ou y présenteraient un empilement très lâche ; ceci serait associé à des modifications chimiques réversibles (acétylation, par exemple) des quatre histones nucléosomiques, ou bien à des variations des histones H1, nécessaires au pontage. La participation des protéines non histones dans ces régions particulières a aussi été démontrée.

Contrairement à ce qui a longtemps été cru, en raison du fait que les histones nucléosomiques sont identiques dans tous les tissus, les données les plus récentes suggèrent que celles-ci n'ont pas seulement un rôle passif d'empaquetage de l'ADN. Il semble qu'elles jouent aussi un rôle clef dans la régulation de l'activité des gènes, en particulier en interagissant directement avec des facteurs activateurs de la transcription (voir plus loin). On a prouvé que les nucléosomes ne sont pas toujours disposés aléatoirement le long de l'ADN, mais placés préférentiellement en des sites précis des gènes. On a de plus démontré *in vitro* qu'il existe des phénomènes de compétition entre ces deux types de protéines, vis-à-vis de l'ADN, conduisant à une activation ou à une répression de la transcription. Dans tous les cas, celle-ci s'effectuant sur un ADN restant organisé en nucléosomes, il faut imaginer que ces derniers subissent momentanément des modifications importantes de type ouverture en deux héminucléosomes, ou dissociation partielle ; l'ADN doit en effet être rendu accessible à l'ARN polymérase et aux facteurs généraux de transcription qui lui sont associés, lors de sa progression le long du gène.

7.2.4. Contrôle du démarrage de la transcription

Le mécanisme de démarrage de la transcription des gènes de protéines chez les Eucaryotes implique, outre l'ARN polymérase II, l'intervention de deux types de facteurs protéiques, qui font évidemment partie de la catégorie des protéines non histones signalées plus haut. Pour exercer leur action, ces facteurs doivent s'associer à l'ADN et s'assembler en complexes de grande taille au niveau de régions régulatrices, situées généralement en amont de la zone à transcrire.

• Des **facteurs de transcription**, dits **généraux**, sont impliqués dans le démarrage de ce processus au niveau de tous les gènes transcrits par l'ARN polymérase II. Le premier d'entre eux à se lier à l'ADN reconnaît la «boîte TATA» du promoteur et il s'y fixe solidement. D'autres protéines, elles-mêmes constituées de plusieurs sous-unités, viennent ensuite s'associer à ce dernier de façon ordonnée ; cinq facteurs au moins de ce type sont connus. C'est sur cet édifice que se fixe l'ARN polymérase II, formant ainsi le **complexe de pré-initiation**. La réalisation de ce complexe est suffisante, pour un certain nombre de gènes, pour permettre à la polymérase de démarrer la transcription du gène et assurer un niveau de base de production des transcrits (voir *figure* 8.28).

• Des **facteurs d'activation de la transcription** sont en outre indispensables, soit pour assurer une transcription basale de certains gènes, soit plus généralement, pour augmenter de façon considérable le taux de production des ARNm. C'est cette catégorie de facteurs qui est attendue dans le cas de contrôles intervenant dans la modulation hormonale ou dans la différenciation cellulaire. Il s'agit ici typiquement d'un **contrôle positif**, dont le principe a été annoncé dans le chapitre 4. Les protéines régulatrices se fixent sur des régions de l'ADN situées le plus souvent (mais pas nécessairement) en amont du promoteur, que l'on nomme **éléments amplificateurs**, ou activateurs d'expression. Ces sites peuvent être localisés à des milliers ou des dizaines de milliers de paires de bases du gène à stimuler proprement dit. Les facteurs de transcription spécifiques mis en jeu sont présents dans les cellules en très faibles quantités ; ils pos-

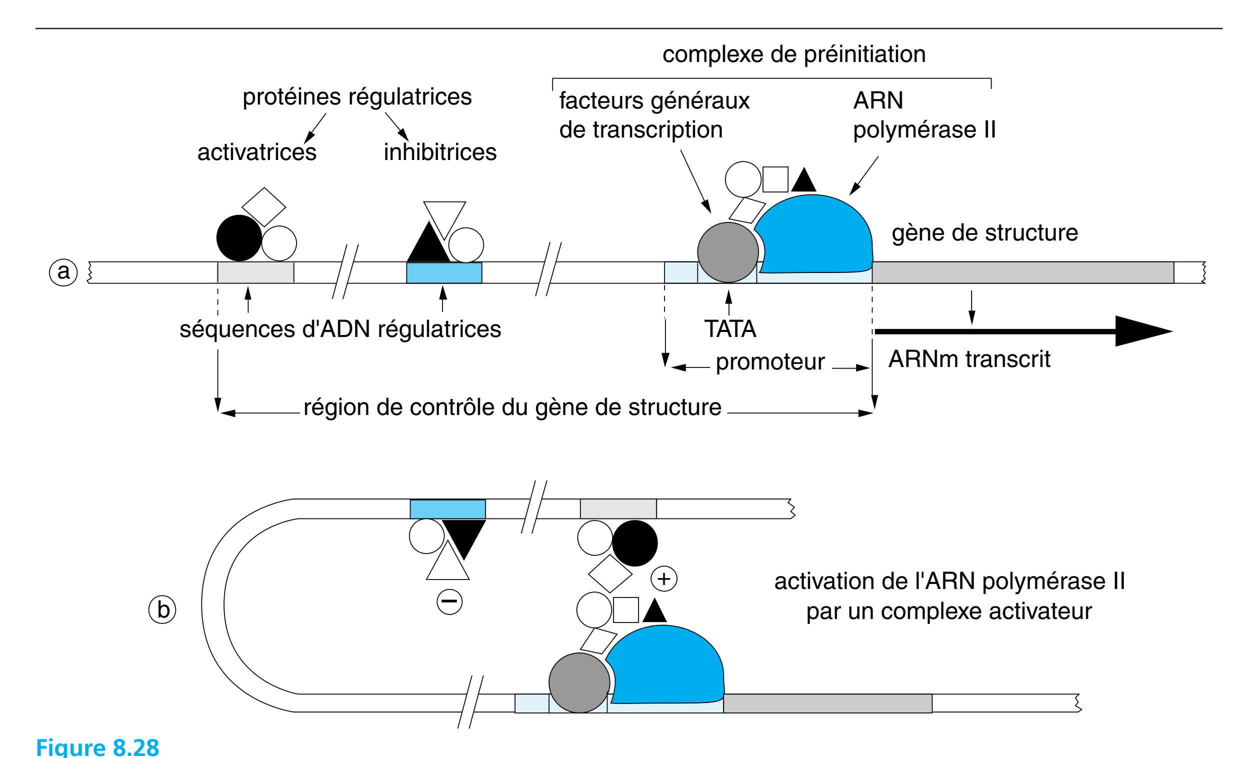


Figure 8.28

Schéma simplifié de la région régulatrice de l'expression d'un gène de protéine eucaryotique typique

(a) La région promotrice proprement dite, avec les boîtes TATA (seule représentée ici) et CAAT, est située immédiatement en amont du point de départ de la transcription ; elle est reconnue par les facteurs généraux associés à l'ARN polymérase II. Les séquences régulatrices d'ADN, reconnues par des protéines activatrices ou inhibitrices, figurées ici en amont du gène, peuvent aussi être situées en aval de celui-ci, ou même dans des introns.
(b) Mode d'action d'une séquence activatrice, grâce à l'interaction entre diverses protéines qui lui sont associées et le complexe de préinitiation fixé sur le promoteur.

sèdent au moins deux types de domaines car ils agissent en se fixant d'une part au niveau de ces séquences et, d'autre part, au complexe de préinitiation décrit plus haut, qui se trouve alors fortement activé. Ceci implique évidemment la réalisation de longues boucles entre les deux régions de la molécule d'ADN ainsi concernée. Certaines protéines régulatrices agissent cependant en inhibant la transcription, lorsqu'elles sont fixées sur leurs séquences spécifiques (**contrôle négatif**). L'effet global d'un ensemble régulateur (promoteur et amplificateur) dépend de l'interaction complexe de nombreuses protéines, la plupart ayant une action activatrice et certaines une action inhibitrice.

L'étude de la structure précise d'un grand nombre de facteurs de transcription montre que l'on peut les classer en plusieurs catégories, selon la nature de leur motif d'interaction spécifique avec l'ADN. La description de ces différents motifs, nommés de façon imagée : « doigts à zinc », « hélice-boucle-hélice », « fermeture éclair à leucine », etc. (on en connaît au moins cinq différents), dépasse le cadre de cet ouvrage. Ce domaine est en plein développement et l'on a identifié, depuis une vingtaine d'années, plusieurs centaines de ces facteurs de régulation de l'activité des gènes. On sait, par exemple, que la détermination des cellules des somites, chez les embryons de Vertébrés, en myoblastes, puis leur fusion et leur différenciation en cellules musculaires striées, est sous le contrôle de trois gènes agissant successivement, qui codent autant de facteurs de transcription. De même, l'étude du développement précoce de la drosophile montre que de tels facteurs jouent un rôle capital dans la détermination des polarités antéropostérieure et dorsoventrale de l'embryon, ainsi que dans l'identité des segments.

Alors que l'on commence à peine à déchiffrer les principes des mécanismes de régulation de gènes individuels, on se rend compte qu'ils mettent en jeu une profusion de molécules régulatrices interagissant au sein de réseaux d'une grande complexité. La connaissance de tous les gènes d'un organisme complexe ne suffit pas pour décrire la

façon dont il se construit au cours de l'embryogenèse précoce : plus que les produits des gènes, ce qu'il est important d'identifier, c'est la manière dont ils interagissent ! Avec la découverte d'un nombre croissant de facteurs de régulation, des outils se mettent cependant en place, qui permettront sans doute de répondre aux questions posées par la biologie du développement, discipline qui connaît actuellement un essor considérable.

7.2.5. Mécanismes post-transcriptionnels de contrôle

Si le contrôle de l'initiation de la transcription est la forme majeure de régulation des gènes, on connaît de nombreux autres mécanismes agissant plus en aval et permettant de moduler la production ultime des protéines ; il n'est pas possible, dans le cadre de cet ouvrage, de les décrire tous et seuls deux d'entre eux seront développés.

• **Contrôle de la maturation des transcrits** ; il s'exerce à travers l'épissage alternatif, qui a été introduit plus haut. On connaît un nombre croissant d'exemples de gènes eucaryotiques produisant, de façon contrôlée, de multiples protéines grâce à ce mécanisme. Il s'agit bien d'un processus intervenant dans la différenciation cellulaire, car les molécules obtenues sont en général peu différentes les unes des autres. Bien que présentant de légères modifications de structure, elles gardent en effet des fonctions voisines. Ces **isoformes** constituent, soit des adaptations à des besoins tissulaires spécifiques (localisation cellulaire, durées de vie différentes, etc.), soit un moyen d'élargir le champ des interactions avec d'autres protéines cellulaires.

On trouve des exemples dans les domaines du cytosquelette, des matrices extracellulaires, des récepteurs et des transporteurs membranaires, qui présentent une extraordinaire diversité chez les organismes supérieurs. Chez le rat, on montre par exemple que la tropomyosine est légèrement différente selon qu'on s'adresse aux muscles lisses ou striés, aux fibroblastes, aux myoblastes ou aux cellules nerveuses ; l'épissage alternatif est responsable de ce phénomène. De même, la fibronectine fabriquée par les fibroblastes reste dans la matrice extracellulaire, alors que celle fabriquée par le foie est secrétée dans le plasma ; or, la première résulte de la traduction d'un ARNm possédant deux exons de plus que celui fabriqué par les hépatocytes, le gène étant ici aussi unique. Dans un petit nombre de cas, cependant, l'épissage alternatif est utilisé pour produire des polypeptides ayant des propriétés très différentes selon les tissus ; on peut citer l'exemple d'un même gène qui est à l'origine de deux hormones distinctes, l'une dans la thyroïde : la calcitonine, et l'autre dans le système nerveux : le peptide CGRP.

En constituant une source potentielle de diversité protéique, ce mécanisme apporte aux cellules eucaryotiques une grande souplesse génétique. Ce phénomène conduit enfin à élargir la définition moléculaire classique du gène, selon laquelle celuici code un ARN unique, soit de structure (ARNr, ARNt), soit messager (produisant alors une seule chaîne polypeptidique).

• **Contrôle de l'utilisation et de la stabilité des ARNm**. La durée de vie des ARNm eucaryotiques varie en général de quelques minutes à plusieurs dizaines d'heures ; les plus instables d'entre eux codent le plus souvent des protéines régulatrices ou des hormones, dont le rôle dans, ou hors de la cellule, doit être limité dans le temps. Des expériences de génie génétique démontrent que ces différences importantes de stabilité sont liées à la présence, dans la région 3′ OH non traduite des ARNm instables, de séquences particulières riches en U et A, qui induisent la perte de la queue de poly-A et entraînent de ce fait leur dégradation rapide (les causes exactes restant inconnues).

Deux types de mécanismes, agissant directement sur les ARNm, conduisent à une modulation de leur traduction ; ils mettent en jeu les régions non traduites situées à leurs extrémités 5′ P et 3′ OH. Il existe en particulier une possibilité de fixation de protéines spécifiques au niveau de structures en double hélice (tige-boucle) de 30 nucléotides environ, situées dans la région 3′ de certains ARNm. Cette fixation inhibe le fonctionnement normal des séquences d'instabilité signalées plus haut et augmente ainsi la durée de vie des ARNm, entraînant une augmentation de la synthèse des protéines correspondantes. Il existe également un contrôle négatif, exercé par des protéines de type **répresseur de la traduction**, qui agissent en se fixant au niveau de structures équivalentes, mais rencontrées à l'extrémité 5′ de la molécule. La mise en place du ribosome se trouve, de ce fait, inhibée et la synthèse protéique ne peut démarrer.

Parmi les exemples d'ARNm à durée de vie exceptionnellement longue, il faut signaler ceux présents dans les ovocytes et les œufs non fécondés de nombreux Animaux. Ces ARNm sont stoc-

kés, sans être traduits, pendant des mois jusqu'au moment de la fécondation ; leur existence est démontrée par le fait qu'ils peuvent être traduits de façon artificielle, dans des systèmes *in vitro*, après purification. On a montré qu'ils sont protégés de la dégradation et rendus inactifs par une association étroite avec des protéines inhibitrices de la traduction. La traduction de ces **ARNm** dits **maternels**, débute brutalement quelques minutes après la fécondation et se poursuit pendant plusieurs heures. Ils constituent une information maternelle dont hérite l'embryon, et les premières protéines que celui-ci synthétise ne sont pas codées par son génome propre. Ceci est cohérent avec le fait que les premières étapes du développement embryonnaire (segmentation) consistent dans des divisions souvent extrêmement rapides, au cours desquelles seule la réplication de l'ADN est assurée, la transcription ne pouvant être réalisée dans le même temps.

Perspective biomédicale

Les thérapies géniques

La thérapie génique est une nouvelle méthode de traitement de pathologies graves (héréditaires ou pas), le plus souvent incurables, liées à des dysfonctionnements des gènes. Le principe consiste à introduire dans les cellules affectées un gène étranger (transgène) permettant de restaurer la fonction défaillante. Conçues initialement comme le moyen unique de guérir les maladies génétiques (en général monogéniques), les technologies de transfert des gènes trouvent actuellement des applications dans le traitement des cancers, des maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives et de certaines maladies infectieuses : virus, paludisme, SIDA.

Seule la thérapie génique somatique, qui exclut la transformation des cellules sexuelles, est envisageable chez l'Homme (chez l'animal, en revanche, la transgénèse et la réalisation d'OGM sont devenues très courantes). Les principales étapes de cette technologie sont les suivantes : 1) clonage du gène d'intérêt par les méthodes de la biologie moléculaire, 2) intégration de ce gène dans une molécule d'ADN (ou «construction génétique») susceptible de fonctionner durablement dans une cellule (après insertion ou pas dans son génome), 3) introduction dans un vecteur transportant l'ADN dans les cellules affectées.

On parle de thérapie *ex vivo* lorsqu'on prélève des cellules malades du patient pour les transformer *in vitro* et les guérir, puis les réintroduire dans l'organisme. Il s'agit en fait d'une autogreffe, qui ne pose pas de problème de rejet. Seuls quelques types cellulaires capables de se diviser en culture sont concernés par cette thérapie : cellules souches médullaires, lymphocytes, myoblastes, hépatocytes ou fibroblastes. La thérapie in vivo consiste à apporter le gène thérapeutique, via un vecteur, à tout l'organisme, en espérant que les cellules malades seront atteintes. L'inconvénient de cette stratégie est que l'on ne contrôle pas toujours l'efficacité du transfert du gène dans les cellules cibles. Ce cas s'applique lorsque les organes atteints ne peuvent pas être prélevés (cerveau, poumons), ou lorsque des organes ou des types cellulaires variés sont touchés. Dans la thérapie *in situ*, les vecteurs sont mis en contact direct avec les tissus malades, comme la trachée (mucoviscidose), les muscles (dystrophie musculaire) ou les tumeurs.

Quelle que soit la stratégie utilisée, le problème majeur est celui du vecteur apportant le gène. Les vecteurs les plus utilisés sont des virus, qui ont naturellement développé des mécanismes très efficaces pour reconnaître leurs cellules cibles, y introduire leur information génétique et s'y exprimer. Trois types de virus ont été étudiés : les rétrovirus, les adénovirus et le virus de l'herpes. Ces virus sont rendus inoffensifs par la suppression de l'essentiel de leur matériel génétique (virus défectifs), qui est remplacé par la construction incluant le gène curateur et les signaux d'expression appropriés.

En raison de diverses difficultés, liées à la biologie des virus (les rétrovirus n'infectent que des cellules qui se divisent, par exemple), ou à des problèmes de sécurité dans leur production, des vecteurs synthétiques tels que des liposomes ou des complexes transfectants ont été développés. Ces derniers sont le plus souvent des polymères cationiques qui condensent et protègent l'ADN, et sont aisément absorbés par les cellules (grâce à l'endocytose). Le ciblage de ces particules vers les cellules malades s'effectue par greffage de molécules telles que : sucres, peptides, hormones, qui sont reconnues par des récepteurs cellulaires spécifiques. Un problème crucial reste celui de l'expression durable du transgène dans les cellules, ainsi que la possibilité de réguler son expression.

Près de 70 % des essais cliniques actuels concernent les cancers, qui peuvent être traités au moyen de l'introduction de gènes dits «anti-oncogènes». On sait en effet que la moitié des cancers sont dus à la mutation de tels gènes (par ex., P53). Il est également possible de renforcer génétiquement les défenses immunitaires contre les cellules anormales, ou de les sensibiliser à des drogues qui les tueront.

Résumé

Le matériel génétique des Eucaryotes est pour l'essentiel représenté par la chromatine, localisée au sein du noyau ; celle-ci est séparée du cytoplasme par l'enveloppe nucléaire, percée de pores, qui est le lieu d'un intense trafic entre les deux compartiments. L'élément de base de la chromatine est le nucléosome, assemblage compact d'histones et d'ADN, permettant l'empaquetage des longues molécules de ce dernier au sein de plusieurs niveaux de structure superposés.

Les expériences montrant que le noyau contrôle toutes les activités cellulaires sont anciennes et multiples : mérotomie, énucléation et greffes nucléaires. L'activité biochimique de cet organite consiste dans la synthèse, à partir de l'ADN, de molécules d'ARN dont une partie est exportée vers le cytoplasme, où elles interviennent dans la fabrication des protéines. Les chromosomes géants, polyténiques ou en écouvillon, ont permis de visualiser directement tous les mécanismes moléculaires qui se déroulent habituellement au sein du noyau, mais dans un contexte beaucoup plus difficile à analyser. Les *puffs* et les boucles étalées de ces chromosomes originaux sont le lieu d'une transcription intense, qui se manifeste sous la forme de grands complexes moléculaires au sein desquels les transcrits sont recouverts de nombreuses protéines.

Il existe des différences importantes de nature et de fonction entre les ARN rencontrés dans le noyau et ceux présents dans le cytoplasme ; ces derniers sont des formes fonctionnelles stables, toutes associées à la synthèse des protéines, et intervenant soit dans la machinerie de synthèse (ARNr et t), soit dans le codage des protéines (ARNm). Les ARN nucléaires sont en grande majorité des molécules naissantes ou en train de subir de multiples événements de maturation ; ce sont des molécules en général de masse moléculaire élevée (précurseurs), de taille hétérogène et de durée de vie très courte. La maturation des ARN pré-messagers, transcrits par l'ARN polymérase II, implique des modifications terminales de ces derniers, mais aussi l'excision de longs segments (introns) intercalés entre les zones codantes (exons) qui servent à spécifier les protéines. Une machinerie spécifique, d'une grande complexité et d'une grande précision, est mise en œuvre pour cette opération.

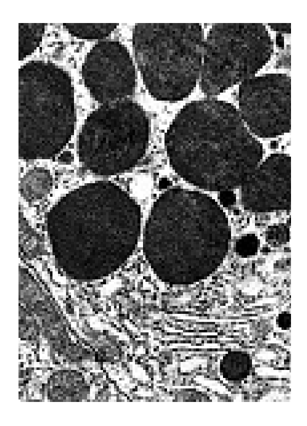
Les nucléoles sont le lieu de la transcription des ARNr ; elle se réalise sur des gènes répétés, qui constituent les organisateurs nucléolaires. La maturation des précurseurs des ARNr (polymérisés par l'ARN polymérase I) s'y effectue en même temps que les sous-unités ribosomiques s'assemblent, en utilisant diverses protéines importées, à fonction enzymatique ou structurale.

L'expression des gènes est contrôlée aussi bien au niveau transcriptionnel que traductionnel ; quelques rares cas de modifications du nombre de gènes sont cependant connus. Cette régulation transitoire ou définitive (dans le cadre de la différenciation) chez les Eucaryotes, implique le plus souvent des mécanismes d'activation des gènes, qui nécessitent des protéines capables de se lier aux promoteurs. L'identification de séquences spécifiques d'ADN, amplificatrices ou inhibitrices, localisées dans toutes les régions du génome, permet de comprendre une partie de l'ensemble du réseau d'interactions infiniment complexe qui préside à la régulation de ce dernier.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Décrire les différents éléments constituant l'ultrastructure du noyau.
2. Représenter l'organisation précise d'un complexe de pore nucléaire et décrire brièvement son rôle physiologique.
3. Rappeler l'organisation moléculaire des nucléosomes.
4. Comment se présentent cytologiquement l'euchromatine et l'hétérochromatine, et comment sont-elles organisées au plan moléculaire ?
5. Quelles sont les caractéristiques biochimiques et moléculaires des histones nucléosomiques et inter-nucléosomiques ?
6. Quelles expériences anciennes ont permis de démontrer l'importance du noyau dans la vie des cellules ?
7. Comment montre-t-on que le noyau est le lieu d'une importante synthèse d'ARN qui est ensuite exporté vers le cytoplasme ?
8. Qu'appelle-t-on chromosomes polyténiques ? quelle est leur origine ?
9. Quelle est l'activité caractéristique des *puffs* ? comment la met-on en évidence ?
10. Rappeler l'organisation des chromosomes en écouvillon.
11. En quoi les chromosomes géants ont-ils été très utiles pour analyser les mécanismes de l'expression des gènes chez les Eucaryotes ?
12. Quelles sont les différences biochimiques majeures existant entre les ARN nucléaires et les ARN cytoplasmiques ?
13. Combien existe-t-il d'ARN polymérases distinctes chez les Eucaryotes ? quelles sont leurs particularités fonctionnelles ?
14. Quels sont les signaux qui, le long de l'ADN, interviennent dans les processus de démarrage et de terminaison de la transcription chez les Eucaryotes ?
15. Quel est l'apport de la microscopie électronique dans la compréhension des processus moléculaires de la transcription ?
16. Décrire les principaux événements intervenant lors de la maturation des transcrits primaires des ARNm.
17. Qu'appelle-t-on organisateur nucléolaire ? quelle est sa caractéristique structurale majeure ?
18. Quelles sont les particularités de la maturation des ARN préribosomiques ?
19. Décrire les différentes étapes de la fabrication des sous-unités ribosomiques au sein des nucléoles.
20. Qu'appelle-t-on détermination ? en quoi est-elle différente de la notion de différenciation terminale ?
21. Rappeler les différents niveaux possibles de contrôle de l'expression des gènes.
22. Quels principaux types de facteurs de transcription connaît-on ? quelle est leur spécificité d'action ?
23. Citer quelques mécanismes de contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes.
24. Qu'appelle-t-on «épissage alternatif» ? Rappeler brièvement son principe et présenter ses conséquences physiologiques sur la synthèse des protéines.



Chapitre 9

SYNTHÈSE ET ROUTAGE DES PROTÉINES CHEZ LES EUCARYOTES. BIOGENÈSE DES ORGANITES

Les chapitres qui précèdent démontrent que la plupart des activités cellulaires, qu'elles soient métaboliques ou relatives à l'expression des gènes, convergent vers une fonction centrale : la synthèse des protéines. Ces macromolécules constituent en effet l'ensemble des structures cellulaires, et sont à la base de tous les phénomènes vitaux. Sous cet angle on peut distinguer, de façon schématique mais pratique, deux catégories de cellules au sein du monde vivant : 1) celles qui se divisent régulièrement, et dont l'activité essentielle semble être la prolifération, et 2) celles qui ne se divisent plus mais qui sont amenées, au sein d'organismes pluricellulaires, à accomplir des fonctions spécialisées et durables (voir chapitre 14).

Les premières vivent de façon générale à l'état isolé, comme les êtres unicellulaires (Protistes) ou les cellules en culture par exemple, mais elles peuvent aussi appartenir à des organismes en croissance ; chez les individus adultes, il faut rappeler l'existence des cellules-souches, à multiplication indéfinie. Au cours de leur cycle cellulaire (voir chapitre 13), elles doivent multiplier par deux leur volume et le nombre (ou la surface) de leurs organites de sorte que les deux cellules-filles qui en dérivent par division héritent d'un assortiment normal de tous leurs constituants caractéristiques. Le problème majeur posé à ces cellules est donc celui de la constante biogenèse de nouveaux organites, dont on verra à cette occasion qu'ils se «reproduisent à l'identique» de manières très diverses.

Les cellules différenciées des organismes pluricellulaires, qui ne se divisent plus (ou bien très lentement), n'ont pas ces problèmes d'augmentation rapide de leur masse mais elles doivent néanmoins assurer le renouvellement permanent de leurs molécules et de leurs structures vieillissantes. Parmi ces cellules spécialisées, nombreuses sont celles qui fabriquent en outre des protéines qui ne sont pas destinées à leur propre organisation, mais sont sécrétées, c'est-à-dire émises à l'extérieur du cytoplasme ; nous en verrons divers exemples plus loin. Il s'agit donc ici davantage d'un problème de maintien des compartiments et de leur identité au cours du temps, que de croissance nette au cours de la vie de la cellule. Dans tous les cas, les cellules doivent cependant fabriquer à tout instant une panoplie très étendue de protéines.

1. PROBLÉMATIQUE : LE CONCEPT DE ROUTAGE

1.1. Conséquences de la compartimentation et de la polarité cellulaire

Chez la plupart des Bactéries, le nombre de compartiments ou de territoires distincts identifiables est très limité : le hyaloplasme, la membrane cytoplasmique, les appendices externes liés à celle-ci et enfin la paroi. Les Bactéries les plus complexes peuvent contenir en outre des systèmes vésiculaires (thylakoïdes) ainsi qu'une membrane externe et un espace périplasmique. Les 3 à 4 000 protéines qui constituent ces structures sont synthétisées au niveau de ribosomes localisés en deux endroits

seulement de la cellule : le hyaloplasme et la face interne de la membrane plasmique ; les premiers, libres, élaborent les protéines destinées à fonctionner sur place, tandis que les seconds, liés, conduisent à la synthèse de protéines restant incluses dans la bicouche ou à celle de protéines sécrétées à l'extérieur de la cellule (ou dans l'espace périplasmique). Les mécanismes moléculaires mis en œuvre, dans ce dernier cas, sont semblables à ceux qui seront décrits chez les Eucaryotes. Aucun mécanisme de distribution élaboré et aucune voie de circulation de grande ampleur ne semblent donc nécessaires chez les Bactéries pour rendre compte de leur construction.

En revanche, les cellules eucaryotiques font l'objet d'une compartimentation poussée, caractéristique qui les différencie fondamentalement des Procaryotes (voir chapitre 2). Les divers organites qui les constituent sont tous formés de protéines, et tous sont limités par au moins une membrane. Certains d'entre eux sont d'une grande complexité structurale, équivalente à celle d'une Bactérie ; il s'agit en particulier des organites dits semi-autonomes : mitochondries et chloroplastes, qui présentent plusieurs compartiments internes. Si l'on fait simplement le compte du nombre total des types de membranes et des cavités identifiables contenues dans une cellule eucaryotique banale, qui représentent autant de lieux de destination distincts pour les protéines, on prend la mesure du problème majeur que pose son édification.

Comment une protéine quelconque, parmi les milliers d'espèces fabriquées à tout instant dans la cellule, peut-elle reconnaître spécifiquement sa destination, souvent unique, parmi plusieurs dizaines ? Comment, puisqu'un nombre très limité de compartiments est capable de les fabriquer, ces protéines peuvent-elles aussi atteindre leur but, après avoir éventuellement franchi plusieurs membranes ? Lorsqu'on envisage des cellules différenciées, généralement polarisées, les choses sont encore plus compliquées dans la mesure où, par exemple, leur simple membrane plasmique est susceptible de présenter localement différents territoires spécialisés : bordure en brosse munie de microvillosités absorbantes chez l'entérocyte, face apicale sécrétrice de la cellule exocrine pancréatique, terminaison synaptique du neurone… Il est inconcevable, sans des mécanismes d'une grande précision, que puissent se maintenir, au cours des phénomènes de renouvellement et de croissance, les édifices supramoléculaires et les structures qui sont à la base de toutes les activités cellulaires. Ces mécanismes, gros consommateurs d'énergie, ne sont pas encore complètement élucidés.

Il s'agit donc de savoir : 1) où sont fabriquées les protéines dans la cellule, et 2) comment elles sont dirigées vers chaque compartiment. Les questions posées sont identiques à celles rencontrées, à l'échelle humaine, lors de l'acheminement du courrier ou des marchandises. Ce sont des problèmes de **logistique** : comment une lettre arrive-t-elle à destination ? quels trajets un produit suit-il depuis son lieu de fabrication jusqu'au présentoir du magasin ? et quels moyens sont utilisés pour cela ? En résumé, la connaissance de la circulation des protéines implique que soient identifiés leurs lieux de synthèse, leurs mécanismes de transport et les mécanismes de signalisation mis en jeu. Par analogie, on parle de **routage**, d'**aiguillage** ou d'**adressage**, pour désigner l'ensemble de ces processus se déroulant au sein des cellules.

1.2. Lieux de synthèse protéique chez les Eucaryotes

Comme on l'a vu dans les chapitres 4 et 8, les cellules eucaryotiques possèdent jusqu'à trois types de génomes différents : nucléaire, mitochondrial et chloroplastique ; à ces génomes correspondent trois types de ribosomes spécifiques et trois lieux de synthèse des protéines. Le hyaloplasme est le lieu de l'expression des gènes nucléaires, tandis que les organites semi-autonomes expriment en leur sein même leur information génétique propre. Nous avons déjà souligné le fait que cette dernière est incapable, en raison de sa petite taille, de coder la totalité des protéines entrant dans la constitution de ces organites ; les gènes correspondants sont donc portés par les chromosomes nucléaires. La question de l'aiguillage d'un grand nombre de protéines exogènes vers les mitochondries et les plastes est donc clairement posée ; à l'inverse, nous verrons que les rares produits codés par les génomes de ces organites sont seulement destinés à la construction de ces derniers, ce qui simplifie beaucoup leur adressage. Compte tenu de ce qui a été dit plus haut sur la diversité des cibles potentielles dans la cellule, le vrai problème du routage concerne donc uniquement des produits de gènes nucléaires.

1.3. Différents modes de transfert des protéines d'un compartiment à un autre

1.3.1. Passage à travers des pores

Les membranes biologiques sont parfois percées de canaux ou de pores laissant passer librement des molécules dont la taille peut atteindre plusieurs centaines ou milliers de daltons. Des exemples de structures assurant une communication intercellulaire, aussi bien chez les cellules animales (**jonctions communicantes**) que chez les cellules végétales (**plasmodesmes**), seront donnés dans le chapitre 14. Au sein même de la cellule, seuls deux organites possèdent des dispositifs de ce type : 1) les mitochondries, dont la membrane externe est percée de pores organisés grâce à une protéine nommée **porine**, dont la taille est cependant insuffisante pour laisser passer de gros polypeptides (voir chapitre 10), 2) les noyaux, dont nous avons déjà vu que l'enveloppe est munie de **complexes des pores** de grande taille, qui assurent de nombreux échanges nucléocytoplasmiques.

1.3.2. Franchissement direct de membranes

Les bicouches phospholipidiques sont imperméables à toute grosse molécule polaire, comme le sont les protéines solubles du hyaloplasme (voir chapitre 4). De nombreux cas de franchissement direct de membranes par de telles molécules existent pourtant au niveau de différents organites. Ce phénomène complexe implique la présence de protéines intrinsèques, préexistant dans la membrane, et spécialisées dans la translocation de polypeptides partiellement déroulés. La spécificité du transport est assurée par des récepteurs membranaires qui reconnaissent des signaux particuliers portés par les molécules à transporter ; après les avoir reconnues et fixées, ces récepteurs les confient au système chargé de les transférer. Deux familles de signaux existent, correspondant à deux grands modes de transport ; le premier se réalise sur des molécules en cours d'élongation et il est qualifié de **cotraductionnel**, le second concerne des protéines déjà terminées, et il est qualifié de **post-traductionnel**.

1.3.3. Mise en jeu de vésicules

Le transport de matière d'un système membranaire à un autre au moyen de vésicules implique deux processus déjà décrits, à savoir le bourgeonnement et la fusion de membranes (voir chapitre 6). Dans ce cas, le transport concerne à la fois le contenu et le contenant, c'est-à-dire la cargaison (petites molécules ou macromolécules), et la membrane limitante. Lorsqu'ils sont unidirectionnels, les échanges entre compartiments conduisent alors à des conséquences prévisibles, telles que : diminution de la surface du donneur et augmentation de celle du receveur, modification de la nature de leurs constituants membranaires (mélange des bicouches)… Outre la question de la conservation de l'identité des compartiments, ce mode de transfert pose divers problèmes : choix des molécules à transporter, ciblage des vésicules vers un compartiment receveur précis, recyclage éventuel de certains constituants membranaires «précieux»… Nous verrons qu'ici aussi, c'est toujours le couple «signal de surface/récepteur» qui est à l'œuvre et que les interactions entre protéines sont à la base de tout au sein de la cellule.

1.4. Principales méthodes expérimentales mises en œuvre dans l'analyse du routage

Avant de décrire les diverses routes suivies par les protéines, il est utile de rappeler brièvement les principales techniques ayant conduit à leur identification et à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui les déterminent (voir chapitre 3). Les expériences de ***pulse-chase***, associées à l'**autoradiographie**, permettent de visualiser les lieux de synthèse et les trajets suivis par des molécules ayant incorporé un précurseur radioactif. Les méthodes du **fractionnement cellulaire**, combinées aux techniques analytiques de la biochimie (**chromatographie**, **électrophorèse**), complètent l'étude précédente en précisant la nature des composés en jeu et la séquence de leurs transformations au cours du temps. L'**immunocytochimie** autorise la détection *in situ*, à l'échelle des ultrastructures, de molécules protéiques individuelles et le **génie génétique**, depuis peu, permet de construire des protéines chimères grâce auxquelles on peut tester l'influence sur la reconnaissance ou le transport de tel ou tel segment d'une chaîne polypeptidique. Une des dernières avancées remarquables dans ce domaine est la mise au point des **techniques utilisant la GFP** (voir chapitre 3), qui permettent de suivre, en temps réel dans des cellules vivantes, les déplacements des protéines.

2. RÔLE DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES SÉCRÉTÉES

La plupart des cellules sont capables de sécréter des composés de haut poids moléculaire dans le milieu extérieur. En effet, une caractéristique commune aux Procaryotes et aux Eucaryotes est l'élaboration d'une **matrice extracellulaire** mixte, enveloppe faite de polysaccharides et de protéines, dont la fonction a sans doute été initialement de protéger les cellules. La diversité des rôles actuels joués par cette structure, chez les organismes pluricellulaires, est traitée dans le chapitre 13. Chez les Animaux, les protéines sécrétées assurent de nombreuses autres fonctions, qui seront rappelées plus loin. Plusieurs compartiments spécialisés sont impliqués dans ce processus de sécrétion, dont le premier est le réticulum endoplasmique.

2.1. Organisation et ultrastructure du réticulum rugueux et du réticulum lisse

2.1.1. MISE EN ÉVIDENCE ET ORGANISATION GÉNÉRALE

Dès 1897, G. GARNIER mettait en évidence dans le cytoplasme périnucléaire des cellules pancréatiques exocrines, qui sécrètent des sucs digestifs, des structures feuilletées fixant de façon intense la pyronine (un colorant basique) (voir *figure* 9.1). Ce territoire a été appelé **ergastoplasme** pour évoquer l'idée qu'il s'observait particulièrement bien dans des cellules actives, « au travail ». Il est en effet d'autant plus volumineux dans les cellules pancréatiques qu'on s'adresse à des animaux abondamment nourris. Cette activité se reconnaît bien en histologie photonique grâce à l'importance en nombre et en taille des vésicules de sécrétion situées à l'apex de la cellule, c'est-à-dire la face de la cellule tournée vers la lumière de la glande.

Le caractère universel de ces structures chez les Eucaryotes a seulement été reconnu après l'avènement de la microscopie électronique (K. PORTER, 1950). Avec cette technique, on observe un abondant système membranaire limitant des cavités aplaties et souvent superposées (appelées nappes), ou bien formant des canaux contournés au sein du

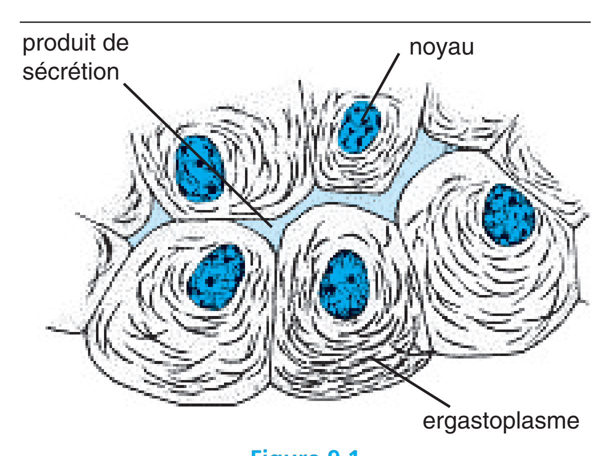


Figure 9.1

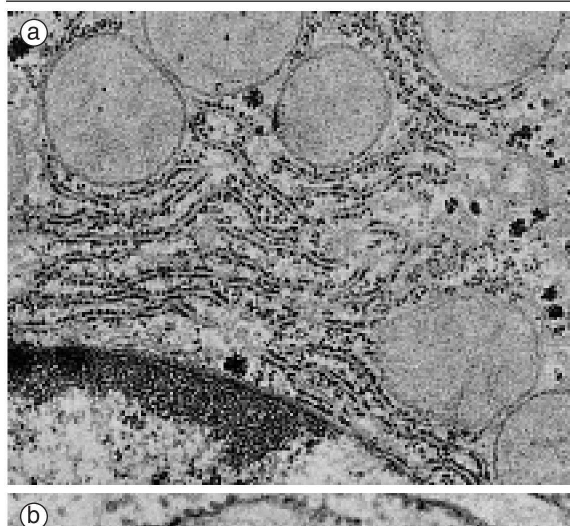
Aspect de l'ergastoplasme dans les cellules pancréatiques de cobaye

Cet organite apparaît en coupe sous la forme de rubans concentriques disposés autour du noyau.
Observation en microscopie photonique (méthode de Brachet).

hyaloplasme. Cet ensemble polymorphe de cavités (ou citernes) plus ou moins dilatées, limitées par une seule membrane de 5 à 6 nm d'épaisseur, et qui emplit toute la cellule, est maintenant appelé **réticulum endoplasmique**. Caractéristique des cellules eucaryotiques, il peut représenter à lui seul 50 à 60 % de la surface des membranes cellulaires totales. Bien que de géométrie complexe dans l'espace, ce compartiment est considéré comme formé d'un seul sac fermé, dont la lumière représente jusqu'à 10 % du volume cellulaire.

L'examen détaillé de ce réseau conduit à distinguer deux types de structures.

• Un réticulum dont la surface externe est tapissée de granules opaques aux électrons de 20 nm de diamètre, qu'on retrouve d'ailleurs à l'état libre dans le hyaloplasme : il s'agit des **ribosomes**, dont il a déjà été question dans les chapitres 4 et 8, au sujet de la synthèse protéique. Les ribosomes associés aux nappes de réticulum sont dits « liés », et on appelle actuellement ce composant du réticulum endoplasmique le **réticulum rugueux** (RR) ou **granulaire** (voir *figure* 9.2). Les ribosomes, qui contiennent des ARN, confèrent à ce compartiment un caractère acide responsable de la fixation des colorants basiques, en histologie classique ; c'est donc ce composant que GARNIER avait décrit et nommé ergastoplasme. À fort grossissement, on observe que les ribosomes sont accrochés par leur grosse sous-unité à la membrane ; dans le cas de coupes tangentielles aux nappes, on constate que les ribosomes liés sont souvent associés en **poly-**



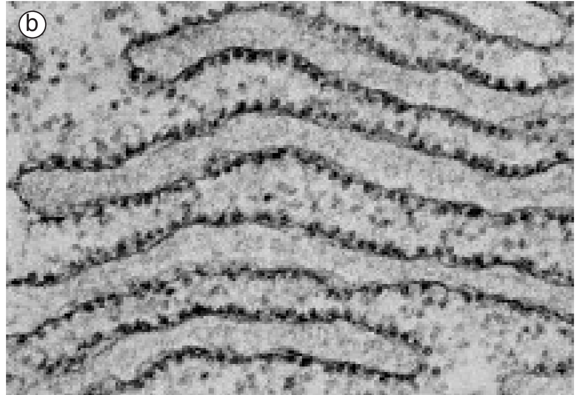


Figure 9.2

Aspect du réticulum endoplasmique rugueux

(a) Coupe de cellule hépatique de cobaye observée en microscopie électronique. **(b)** Les nappes jointives de réticulum montrent de nombreux ribosomes accolés à la face externe de leur membrane limitante.
Grossissements × 24 000 et × 60 000. (Clichés J. André, Labo BC4, Orsay).

somes de forme arquée ou spiralée. Les cellules pancréatiques contiennent un abondant RR se présentant sous formes de nappes serrées et concentriques, disposées tout autour du noyau.

• Un réticulum dont la surface externe est lisse, et qui se présente en général sous forme d'un réseau de canaux ou de tubules contournés et anastomosés ; c'est le **réticulum lisse** (RL) ou **agranulaire** (voir *figure* 9.3). De façon habituelle, ce composant du réticulum est beaucoup moins abondant que le précédent (voir le *tableau* 5.1).

Le RR est en rapport direct avec le noyau de la cellule car la membrane externe de ce dernier est localement en continuité avec lui et porte parfois des ribosomes typiques ; les cavités de ces deux systèmes communiquent donc entre elles. De

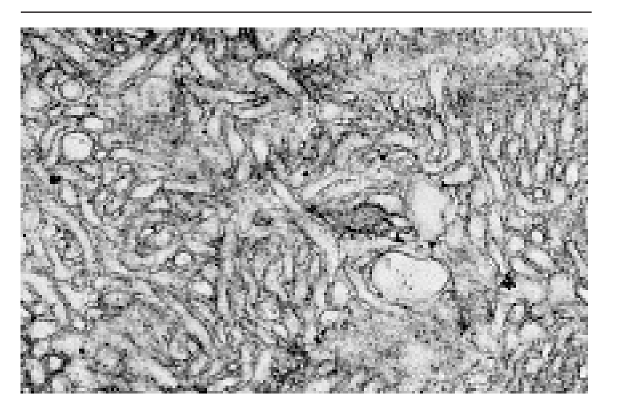


Figure 9.3

Aspect du réticulum endoplasmique lisse

Coupe de cellule stéroïdogène de testicule de rat observée en microscopie électronique. Noter l'aspect tubulaire de cet organite.
Grossissement × 23 000. (Cliché Labo BG, Orsay).

même, et bien qu'elles soient ségrégées dans différentes régions de la cellule, les deux composantes du réticulum sont physiquement en continuité ; il est important de noter ceci pour bien comprendre leur fonctionnement complémentaire, basé sur la fluidité de la bicouche phospholipidique qui permet des échanges de lipides et de protéines entre ces deux régions. Nous verrons plus loin que le RR entre aussi en relation avec l'appareil de Golgi, mais il s'agit de rapports fonctionnels indirects, par l'intermédiaire de nombreuses vésicules, dites **vésicules de transition**. Celles-ci bourgeonnent à partir de saccules particuliers du RR ; elles sont recouvertes d'un feutrage formé de protéines spécifiques, différentes de la clathrine (voir chapitre 6).

2.1.2. Diversité des situations cellulaires

Suivant les types cellulaires, les proportions des deux types de réticulum sont très variables. Le RR est, par exemple, environ 60 fois plus abondant que le RL dans les cellules pancréatiques ; c'est le cas aussi, à un degré moindre, pour les lymphocytes et les fibroblastes. Or, ces trois types de cellules ont en commun de synthétiser et de sécréter en abondance des protéines : respectivement, des enzymes digestives, des anticorps ou des protéines de matrice extracellulaire (collagène, élastine, etc.). En revanche, dans les hépatocytes, le RL est un peu plus abondant que le RR, et dans les cellules endocrines stéroïdogènes (sécrétrices d'hormones stéroïdes), le réticulum endoplasmique existe essentiellement sous la forme RL ; ces cellules sont connues pour être spécialisées dans la synthèse

des lipides et/ou le métabolisme du cholestérol. Nous verrons plus tard que ces exemples nous éclairent sur les fonctions biochimiques majeures assurées par les deux composantes du réticulum.

Les cellules musculaires striées sont caractérisées par un important réseau de tubes lisses intercalés entre les myofibrilles. Ce type de réticulum lisse, appelé **réticulum sarcoplasmique**, a une fonction très différente de celui des cellules banales ou des cellules spécialisées précédentes : il fonctionne comme réservoir d'ions Ca^{2+}, connus pour intervenir dans la contraction musculaire (voir chapitres 6 et 11).

2.2. Trajet intracellulaire des protéines sécrétées. Rôle du réticulum rugueux dans leur synthèse

Le milieu extracellulaire est une des destinations possibles pour les protéines fabriquées par les cellules eucaryotiques ; chez les Animaux, nombreuses sont celles qui se sont spécialisées dans cette activité.

2.2.1. Les protéines sécrétées et leurs fonctions

La diversité des fonctions assurées par les protéines sécrétées ainsi que celle des types de cellules sécrétrices est illustrée dans l'encart suivant par quelques exemples choisis chez les Vertébrés.

Ces protéines sécrétées ont des particularités biochimiques les distinguant nettement de celles qui restent confinées dans le hyaloplasme. Elles sont, d'une part, le plus souvent stabilisées par des ponts disulfure et, d'autre part, elles sont très riches en résidus glucidiques liés de façon covalente à la chaîne polypeptidique : on parlera alors de **glycoprotéines** et de **protéoglycanes**. Ces modifications caractéristiques sont liées au trajet intracellulaire spécifique qui, on le verra, les conduit du réticulum rugueux jusqu'à l'extérieur de la cellule, en passant par l'appareil de Golgi. Certaines sont sécrétées de façon continue par les cellules responsables (protéines sériques, collagène), tandis que d'autres (enzymes, hormones) sont déchargées de manière épisodique, faisant l'objet d'un stockage transitoire au sein de vésicules de sécrétion, dont l'**exocytose** est contrôlée (voir chapitre 6).

2.2.2. Expériences autoradiographiques

Le trajet intracellulaire des protéines sécrétées n'était pas connu avant les célèbres expériences de G. Palade et de son équipe, au milieu des années 60. Cet auteur travaillait sur le **pancréas exocrine** de cobaye, organe connu pour produire un suc digestif riche en hydrolases diverses : amylases, protéases, nucléases, lipases… Les cellules acineuses responsables ont une morphologie et une organisation interne bien typiques, comme la plupart des cellules sécrétrices, d'ailleurs. Leur structure nettement polarisée montre une zone basale présentant un abondant réticulum rugueux entourant le noyau et de nombreuses mitochondries, une zone médiane comportant les dictyosomes de l'appareil de Golgi (voir plus loin), et une zone apicale, tournée vers la lumière de la glande, riche en vésicules de sécrétion (**granules de zymogène**), dont certains éclatent par exocytose à la surface de la cellule.

Ce type d'expérience permet d'identifier le lieu initial de synthèse des protéines (pendant le *pulse*), et leurs voies de transport au sein de la cellule (pendant la chasse) (voir chapitre 3). Une approche

Commentaire

Différents types de protéines sécrétées chez les Vertébrés

- Les **enzymes digestives** : pepsine, trypsine, amylase, nucléases…, sont sécrétées par des glandes ou certains secteurs du tube digestif tels que : glandes salivaires, estomac, pancréas…
- Les **hormones polypeptidiques** : hormone de croissance, insuline, glucagon…, sont sécrétées par les glandes endocrines ou certains territoires du système nerveux.
- Les **protéines** structurales des **matrices extracellulaires** (voir chapitre 13) : collagène, élastine, fibronectine…, sont essentiellement fabriquées par les cellules des tissus conjonctifs (fibroblastes et cellules dérivées), mais aussi par les cellules épithéliales.
- Les **protéines sériques** : albumine, transferrine, lipoprotéines…, émises dans le sang et fabriquées par le foie.
- Les **anticorps**, fabriqués par les cellules sanguines immunitaires appelées lymphocytes.
- Les **protéines de réserve**, telles que l'ovalbumine (blanc d'œuf), la vitellogénine (plaquettes vitellines), ou bien les caséines (protéines du lait), fabriquées respectivement par l'oviducte, le foie ou la glande mammaire…

ENCART TECHNIQUE

Analyse cellulaire du processus sécrétoire

Ce processus a été analysé par une expérience de type ***pulse-chase***, de la façon suivante :

– de fines tranches de tissu pancréatique frais sont mises en survie dans un milieu de culture permettant aux cellules de vivre et de fonctionner pendant quelques heures ;
– de la leucine tritiée (radioactive) est ajoutée au milieu ; celle-ci étant un précurseur des protéines, elle s'y incorpore au cours de l'expérience ;
– une incubation courte (moins de 5 minutes) est suivie d'un rinçage soigneux des cellules, pour éliminer toute radioactivité soluble, et de leur remise dans un milieu normal ;
– des échantillons de tissus sont ensuite prélevés régulièrement (toutes les 20 minutes environ) pendant deux heures, puis fixés et traités pour la microscopie électronique ;
– les coupes obtenues sont traitées pour l'autoradiographie à haute résolution, les grains d'argent observés révélant la présence de protéines radioactives au sein des ultrastructures.

quantitative des clichés autoradiographiques, basée sur le comptage des grains d'argent par unité de surface, conduit à décrire la voie suivante : réticulum endoplasmique rugueux, appareil de Golgi, grains de zymogène et enfin lumière de la glande (voir *figure* 9.4). Cette voie est constante chez tous les Eucaryotes, de même que sa cinétique, qui s'échelonne sur deux heures environ entre le début et la fin du processus. Il existe cependant des exceptions, par rapport à ce dernier point : on connaît le cas des granules corticaux de certains ovocytes animaux, ou celui de l'acrosome des spermatozoïdes, qui sont des granules de sécrétion dont la décharge peut être très retardée (jusqu'au moment de la fécondation).

Ce résultat est en soi très important, mais la méthode ne fournit aucune indication sur les mécanismes moléculaires mis en jeu ; une autre approche doit être développée, donnant la possibilité de décomposer le système en éléments simples et permettant une analyse *in vitro*. Des expériences conduites sur le principe précédemment décrit ont donc été appliquées à des fractions cellulaires purifiées, identifiables aux structures impliquées dans la voie présentée plus haut.

2.2.3. APPORT DU FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Lorsqu'une cellule est homogénéisée, l'organisation du réseau complexe de cavités constitué par le RR ou le RL est totalement détruite, de même que celle qui préside à la structure de l'appareil de



Figure 9.4

Expériences historiques sur la sécrétion des protéines par les cellules pancréatiques

Le phénomène sécrétoire est étudié au moyen d'expériences d'incorporation de leucine tritiée (de type *pulse-chase*), suivies d'autoradiographie. La radioactivité se déplace, au cours du temps, successivement dans les compartiments mis en jeu dans ce processus : réticulum endoplasmique rugueux (rg) ; appareil de Golgi (d) ; vésicules de concentration (vc) et grains de zymogène (gz) ; m : mitochondries ; n : noyau. (D'après J. Jamieson).

Golgi. Paradoxalement, cependant, on arrive à purifier une fraction très pure d'échantillons du RR. En effet, les fragments de membrane issus de l'éclatement du réticulum se referment instantanément, et de façon spontanée, sur eux-mêmes ; ils sont à l'origine de vésicules de taille voisine de 0,1 à 0,2 µm, que l'on appelle des **microsomes** (voir *figure* 9.5). Ces structures artefactuelles sont purifiables par ultracentrifugation (3 h à 100 000 g) à partir de surnageants post-mitochondriaux d'homogénats cellulaires. Les culots obtenus, qui peuvent être observés en microscopie électronique, montrent un mélange de vésicules unimembranaires lisses et de vésicules porteuses de ribosomes sur leur face extérieure (A. CLAUDE, 1947).

Il est possible, sur un gradient de densité préformé de saccharose, de séparer ces deux types de vésicules qui diffèrent par leur densité ; la présence des ribosomes alourdit en effet significativement les vésicules qui les portent. Ces deux fractions purifiées de **microsomes rugueux** et de **microsomes lisses** représentent des structures cellulaires facilement identifiables : les premiers ont une origine unique dans la cellule car ils ne peuvent provenir que du RR ; en revanche, les seconds constituent un mélange complexe de vésicules issues de la fragmentation du RL, de l'appareil de Golgi, voire de la membrane cytoplasmique. L'intérêt des microsomes rugueux, en particulier, est considérable car ils gardent la même polarité structurale que celle du RR d'origine et, pour cette raison, les mêmes propriétés fonctionnelles. Outre une étude biochimique approfondie de ce compartiment, ils permettent aussi l'analyse *in vitro* du processus de synthèse protéique qui y est associé. On a ainsi pu montrer, par exemple, que plus de 20 protéines spécifiques permettent de distinguer les membranes du RR de celles du RL.

Des expériences de type *pulse-chase* ont aussi été conduites par PALADE sur des fractions cellulaires isolées identifiées au RR (microsomes rugueux), à l'appareil de Golgi (ici, la source majeure des microsomes lisses), et aux grains de zymogène (grosses vésicules de sécrétion, facilement reconnaissables). Les résultats obtenus sur le lieu de synthèse et les voies de circulation confirment ceux tirés des analyses autoradiographiques précédentes, et apportent une information supplémentaire : les protéines sécrétées par la cellule ne sont jamais directement en contact avec le hyaloplasme. Que ce soit lors de leur synthèse ou lors de leur cheminement d'un compartiment à l'autre, elles sont toujours empaquetées dans des systèmes membranaires. Cette donnée est très importante car elle montre que le mode de fabrication des protéines sécrétées est unique au sein des cellules.

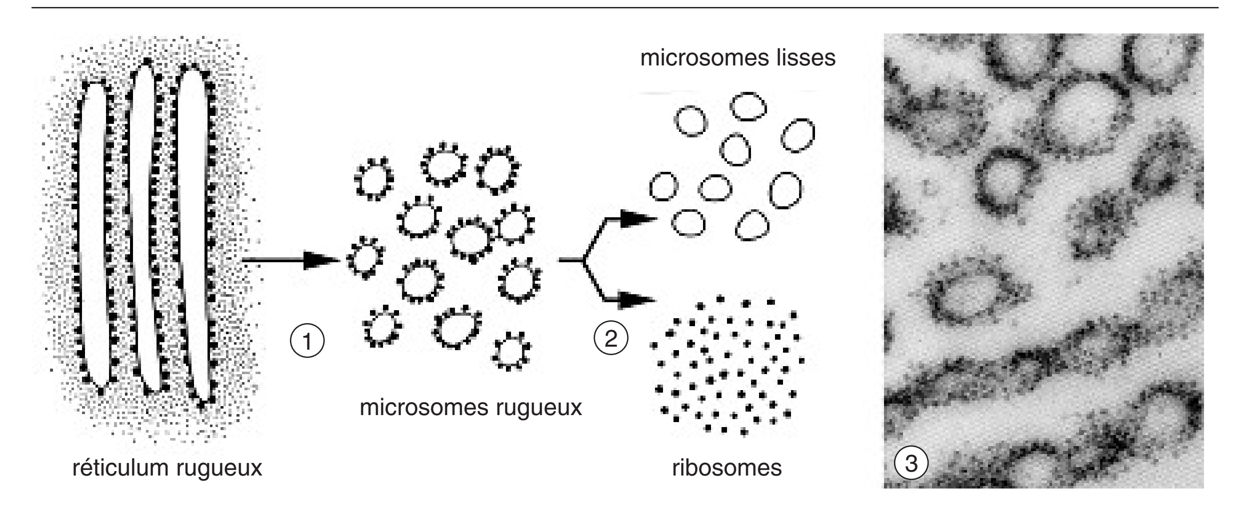


Figure 9.5

Formation des microsomes rugueux

(1) Ces vésicules apparaissent spontanément lors de la pulvérisation du réticulum endoplasmique rugueux, consécutive à l'homogénéisation des cellules. **(2)** Elles peuvent être débarrassées de leurs ribosomes grâce à un détergent doux. **(3)** Aspect des microsomes rugueux sédimentés par centrifugation à forte vitesse, et observés en microscopie électronique. (D'après un cliché de G. Palade).

2.3. Mécanismes d'insertion cotraductionnelle des protéines dans le réticulum rugueux

2.3.1. Systèmes de traduction protéique *in vitro*

Il existe, depuis environ 50 ans, des systèmes acellulaires permettant la synthèse *in vitro* de protéines, lorsqu'on leur fournit les ARN messagers purifiés correspondants (voir chapitre 4). Cette technique est très utilisée en biologie moléculaire pour caractériser des populations d'ARNm obtenus *in vivo* ou *in vitro* ; en biologie cellulaire, elle a contribué à la compréhension des mécanismes de routage des protéines chez les Eucaryotes (voir plus loin). Ces systèmes sont constitués d'extraits obtenus à partir de tissus connus pour être très actifs en synthèse protéique. Les plus classiques sont constitués, soit de lysats de réticulocytes (jeunes globules rouges sans noyau ni réticulum) de poulet ou de lapin, soit de surnageants d'homogénats de germes de blé. Ces extraits contiennent tous les ingrédients nécessaires à la traduction : ribosomes libres, enzymes d'activation, ARNt, facteurs protéiques divers ; ils sont enrichis en acides aminés (dont un ou deux sont radiomarqués ; en général la leucine ou la méthionine) et en un système de fourniture d'ATP (phosphocréatine/kinase) ; ils sont enfin traités par une ARNase diluée qui détruit spécifiquement les ARNm endogènes, afin d'obtenir un bruit de fond minimal. Il suffit d'ajouter les ARNm purifiés pour faire démarrer la synthèse des protéines, que l'on peut ensuite précipiter puis analyser aisément par électrophorèse suivie d'autoradiographie ; celles-ci reflètent en quantité et en qualité la population des ARNm introduite dans le tube.

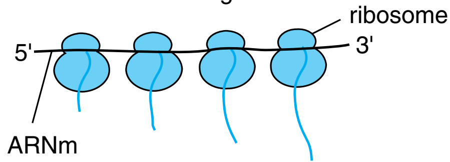
2.3.2. Utilisation des microsomes. Mise en évidence du rôle de la séquence-signal

Les chercheurs disposent de préparations de microsomes purifiés à partir de pancréas, qui peuvent être ajoutés aux systèmes de traduction *in vitro* classiques décrits précédemment. Il est ainsi possible de tester l'influence de leur présence (et donc de celle du RR) sur les mécanismes de la traduction. Les premières expériences décisives ont été conduites au début des années 70, date à laquelle des ARNm purifiés et actifs ont été extraits de cellules sécrétrices spécialisées dans la fabrication d'un nombre limité de protéines connues, ce qui permettait d'identifier aisément les messagers correspondants (exemples : les chaînes légères des immunoglobulines, sécrétées par des cellules cancéreuses de myélomes de souris, ou la prolactine, sécrétée par l'hypophyse).

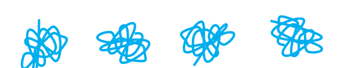
L'observation de base est la suivante : lorsque de tels ARNm purifiés sont utilisés dans des systèmes simples de synthèse protéique *in vitro*, qui n'utilisent que des ribosomes libres (type réticulocyte), on obtient toujours une chaîne polypeptidique plus longue que celle normalement faite *in vivo*. Dans tous les cas analysés, la différence de longueur porte sur une séquence de tête (N-terminale) constituée de quelques dizaines d'acides aminés. Par ailleurs, il suffit d'ajouter au système, dès le début de l'expérience, un certain volume de microsomes rugueux purifiés pour qu'on obtienne la forme normale, courte (appelée forme mature), de la protéine. Si on ajoute en outre au milieu réactionnel, en fin d'expérience, une protéase (enzyme digérant les protéines), on constate que la protéine néosynthétisée s'avère résistante à une attaque protéolytique ; dans les mêmes conditions, la forme longue synthétisée en l'absence de microsomes est sensible à la protéase. Enfin, si la même expérience de protéolyse est faite en présence d'un détergent, la forme courte fabriquée en présence de microsomes devient sensible.

Ces expériences prouvent que la protéine synthétisée selon ce mode est injectée dans les vésicules microsomales en même temps qu'elle est polymérisée par les ribosomes : c'est le processus dit d'**insertion cotraductionnelle**, qui caractérise le fonctionnement du réticulum rugueux (voir *figure* 9.6). Il a également été montré que le peptide de tête, éliminé après la synthèse, sert de moyen de reconnaissance pour diriger les protéines sécrétées vers les membranes du RR ; c'est la **théorie du signal**, formulée vers 1975, qui sera généralisée à tous les types d'aiguillage de protéines dans la cellule, comme on le verra plus loin. La caractéristique commune à toutes les **séquences-signal** trouvées dans les formes immatures des protéines sécrétées (ainsi que celles des protéines membranaires et lysosomales) est qu'elles renferment de quatre à douze résidus hydrophobes à la suite. Il n'existe cependant pas de réelle homologie de séquence entre elles, mais simplement une ressemblance au plan physicochimique.

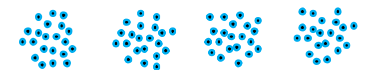
La preuve directe du rôle de cette séquence-signal a été apportée par les techniques récentes du génie génétique. On peut réaliser *in vitro* des



- libération des polypeptides dans le milieu.



- digestion après ajout de protéase dans le milieu.



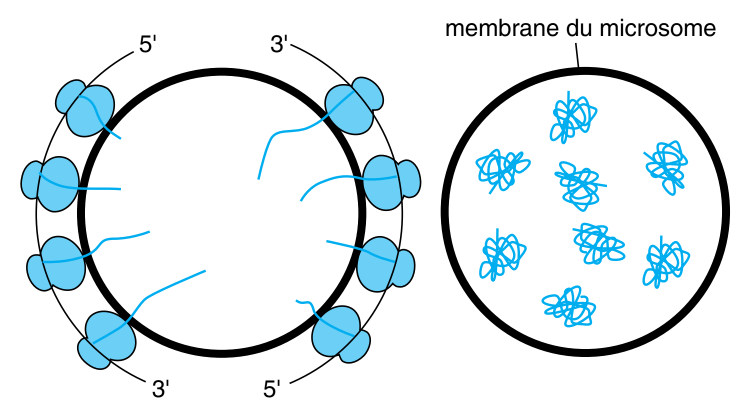


Figure 9.6

Expériences *in vitro* démontrant l'existence du phénomène d'insertion cotraductionnelle

La résistance à un traitement protéolytique et la cosédimentation des protéines marquées avec les microsomes rugueux démontrent qu'elles ont pénétré dans la lumière au cours de leur synthèse.

gènes (et donc des ARNm) codant des protéines chimères artificielles (**protéines de fusion**) combinant une telle séquence hydrophobe à un polypeptide qui n'en possède normalement pas et qui ne suit donc pas la voie des protéines sécrétées. Aussi bien *in vitro* que *in vivo*, désormais, on peut vérifier que cette protéine est dirigée vers les microsomes ou le RR, et fabriquée selon le mode d'insertion cotraductionnelle.

2.3.3. La particule de reconnaissance du signal et son rôle

Contrairement à ce qui avait été cru initialement, ce n'est pas la séquence-signal N-terminale elle-même qui reconnaît la membrane du RR, et entraîne le ribosome en train de fabriquer la protéine qui la porte, vers ce compartiment. Il existe en fait un intermédiaire hyaloplasmique faisant le va-et-vient entre les ribosomes et un récepteur membranaire spécifique situé dans le réticulum, dont le site de reconnaissance est tourné vers l'extérieur : il s'agit de la **particule** dite **de reconnaissance du signal**, ou **PRS** (voir *figure* 9.7).

Quand une PRS libre reconnaît une telle séquence-signal émergeant d'un ribosome en cours de traduction, elle se fixe dessus et se loge simultanément dans le site amino-acide de ce dernier, situé à proximité immédiate. Ceci conduit au blocage momentané de l'élongation de la chaîne polypeptidique, le système ne pouvant se débloquer que lorsque cet énorme édifice entre en contact avec le réticulum rugueux, et plus spécialement avec le récepteur signalé plus haut (**récepteur de la PRS**) (voir *figure* 9.8). C'est donc ainsi

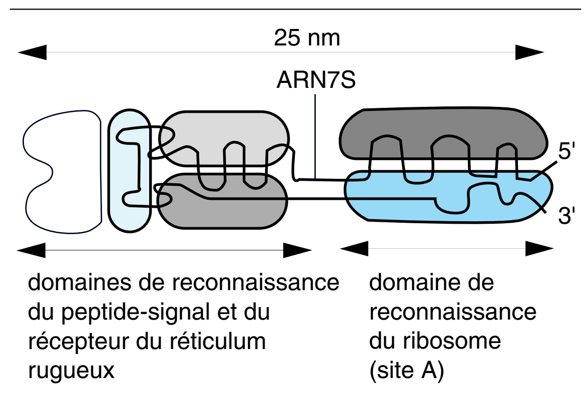


Figure 9.7

Organisation de la particule de reconnaissance du signal

Cette particule de grande taille (25 nm) est de nature ribonucléoprotéique (1 ARN de 300 nucléotides et 6 chaînes polypeptidiques). Elle possède trois domaines, grâce auxquels elle peut reconnaître : 1) le site amino-acide du ribosome, 2) la séquence-signal d'une protéine naissante et 3) le récepteur porté par le réticulum.

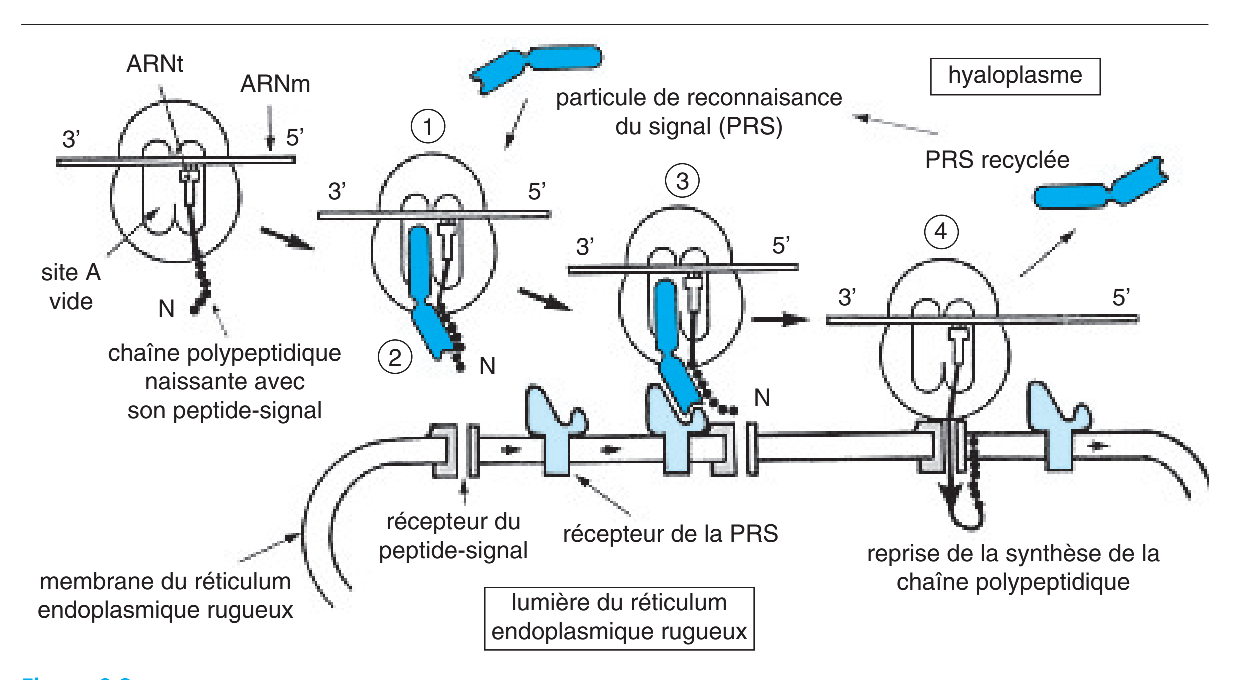


Figure 9.8

Mécanisme de l'insertion cotraductionnelle des protéines dans le réticulum endoplasmique rugueux

Le rôle de la PRS comme agent d'adressage et celui des différents récepteurs membranaires sont mis en évidence au cours des différentes étapes de ce processus. **(1)** Reconnaissance de la séquence-signal et fixation de la PRS. **(2)** Complexe formé par le ribosome et la PRS, logée dans le site A et bloquant la traduction. **(3)** Accrochage du complexe sur la membrane du RR. **(4)** Reprise de la traduction et injection de la chaîne polypeptidique à travers la membrane.

que certains ribosomes seulement, parmi tous ceux qui commencent la synthèse des protéines à l'état libre dans le hyaloplasme, sont aiguillés vers les membranes du réticulum ; à partir de ce moment, la destinée des protéines fabriquées par ces ribosomes est fixée et seul un nombre réduit de compartiments leur sera accessible, que nous décrirons plus tard. En revanche, tous les ribosomes en train de synthétiser des protéines ne possédant pas ce type de séquence-signal termineront leur travail au sein du cytosol, toujours à l'état libre. Il doit être bien clair que le transfert d'une chaîne polypeptidique dans la lumière du RR est conditionné par la nature de l'ARNm et non par les ribosomes eux-mêmes, qui sont tous identiques.

2.3.4. Processus d'insertion cotraductionnelle

Lorsque le complexe ribosome/protéine naissante/PRS est indirectement ancré dans la bicouche par son récepteur, entre en jeu un nouveau système protéique faisant lui aussi partie intégrante de la membrane du réticulum, que l'on nomme **récepteur de la séquence-signal** ; ce système fonctionne schématiquement comme un canal transmembranaire qui prend en charge la séquence-signal, laquelle se libère donc de la PRS. Celle-ci perd alors son affinité pour le site aminoacide du ribosome et le quitte ; la chaîne polypeptidique recommence à s'allonger mais cette fois-ci en traversant la membrane et en étant injectée dans la lumière du réticulum. Enfin, la PRS quitte son récepteur et les deux partenaires sont recyclés, le premier «partant en quête» d'un nouveau ribosome approprié au sein du hyaloplasme, et le second prêt à fixer un nouveau complexe.

En raison de ces caractéristiques, ce processus vectoriel de synthèse et d'injection simultanées d'une chaîne polypeptidique à travers une membrane est nommé **insertion cotraductionnelle**. Un mécanisme basé sur un principe identique intervient dans la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire ou dans l'espace périplasmique, à travers la membrane plasmique, chez les Bactéries.

2.4. Modifications des protéines dans le réticulum rugueux

2.4.1. Clivage de la séquence-signal et acquisition des structures secondaire et tertiaire

Qu'advient-il, *in vivo*, de la chaîne polypeptidique synthétisée à travers la membrane du réticulum ? Le peptide-signal hydrophobe reste momentanément ancré dans la bicouche lipidique, au niveau de son récepteur, et le reste de la protéine est enfilé de façon continue dans la cavité, sous la forme d'une grande boucle. À la fin de l'opération, l'extrémité COOH (la dernière synthétisée) rentre dans la cavité et on peut se représenter la protéine suspendue, accrochée à la membrane, par son extrémité NH_2. Il faut cependant imaginer qu'à mesure que la chaîne protéique entre dans la cavité, celle-ci se replie plus ou moins spontanément pour acquérir ses différents niveaux de structure secondaire et tertiaire. On sait que deux systèmes enzymatiques interviennent ici, d'une part pour mettre en place correctement les ponts disulfure stabilisant la structure tridimensionnelle, d'autre part pour enfouir de façon spécifique les domaines hydrophobes au cœur de la protéine. La deuxième activité est assurée par ce qu'on appelle des **protéines-chaperons**, dont le fonctionnement sera présenté plus loin.

Dans le cas des protéines sécrétées, une enzyme également spécifique du réticulum ruqueux (une peptidase membranaire), clive enfin le peptide-signal et libère définitivement la protéine dans la cavité. C'est la raison pour laquelle les protéines sécrétées sont plus courtes, de quelques dizaines d'acides aminés, que leurs précurseurs dont la synthèse a commencé dans le hyaloplasme.

On comprend ainsi comment toute l'information nécessaire pour diriger une protéine vers le réticulum rugueux est contenue dans la séquence-signal N-terminale, qui est elle-même codée dans l'ARNm du côté 5′ de la phase de lecture (immédiatement après le codon d'initiation AUG). En conclusion, le devenir cellulaire d'une protéine est bien inscrit dans son gène ; évidemment, pourrait-on dire, puisque tout est inscrit dedans, mais encore faut-il savoir comment !

2.4.2. Glycosylation de la chaîne polypeptidique

Une deuxième modification chimique affecte un grand nombre de protéines fabriquées dans le réticulum rugueux, y compris les protéines membranaires, dont on parlera plus tard : il s'agit de la **glycosylation**, ou greffage de résidus glucidiques sur la chaîne polypeptidique. Ce processus se réalise sur les protéines naissantes, en cours d'injection, grâce à des enzymes membranaires nommées **glycosyl-transférases** ; celles-ci ont leurs sites actifs tournés vers la lumière du réticulum rugueux de sorte que leurs substrats sont uniquement les protéines accessibles dans la cavité. C'est pour cette raison que les protéines synthétisées et terminées dans le hyaloplasme, celles qui ne présentent pas la séquence-signal, ne sont en général jamais glycosylées de la manière qui va être décrite.

Les glycosyl-transférases du RR greffent en une seule étape de transfert un motif oligosaccharidique unique constitué de 14 résidus sucrés (ou dérivés), illustré dans la *figure* 9.9. Ce motif, dont la synthèse n'a pas lieu d'être développée ici, est tourné vers l'intérieur du réticulum ; il est porté par une molécule lipidique appelée **dolichol**, ancrée dans la bicouche. La fixation de l'oligosaccharide sur la protéine a lieu sur un résidu NH_2 d'une asparagine, mais seuls certains de ces acides aminés le long de la chaîne seront concernés ; chaque protéine a ainsi un profil de glycosylation caractéristique. On parle donc de **N-glycosylation** dans le réticulum, par opposition à ce qu'on nommera **O-glycosylation**, qui se déroule dans l'appareil de Golgi (voir plus loin) et qui concerne d'autres acides aminés.

Il faut enfin signaler que les motifs glucidiques ainsi greffés sont déjà remaniés avant que les protéines ne quittent le réticulum et ne gagnent le compartiment suivant. En effet, d'autres enzymes nommées **glycosidases** élaguent ces motifs en enlevant certains sucres (glucose et mannose) aux extrémités des trois branches qu'ils portent ; cette première déglycosylation se poursuivra ensuite dans l'appareil de Golgi.

2.5. Devenir des protéines synthétisées au niveau du réticulum rugueux

2.5.1. Insertion de protéines intrinsèques dans les membranes du réticulum

Tous les processus décrits jusqu'ici concernent les protéines libérées dans la cavité du réticulum, et qui seront finalement émises hors de la cellule. Il faut maintenant étudier le cas d'une autre caté-

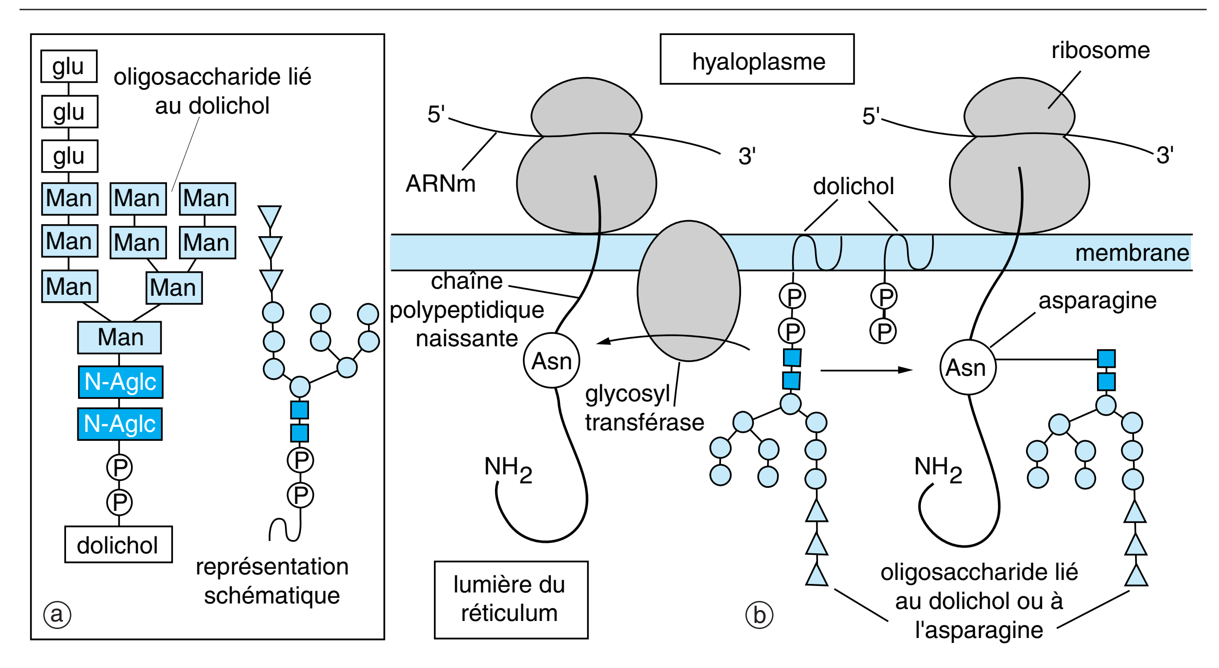


Figure 9.9

Glycosylation dans le réticulum endoplasmique rugueux (N-glycosylation)

(a) Motif oligosaccharidique greffé sur les résidus asparagine. **(b)** Principe de l'accrochage de ce motif à des protéines naissantes (mécanisme cotraductionnel) grâce aux glycosyl-transférases membranaires du réticulum.

gorie importante de protéines : les **protéines membranaires**, qui resteront ancrées dans la bicouche du réticulum lui-même et feront partie intégrante, dans un premier temps, de ce compartiment. Nous avons vu dans le chapitre 5 que les protéines intrinsèques transmembranaires sont parfois disposées de façon très complexe dans la bicouche : si, dans certains cas, un seul segment hydrophobe en hélice α suffit à ancrer la protéine, dans beaucoup d'autres, plusieurs segments font des aller et retour à travers les phospholipides, déterminant des boucles hydrophiles de chaque côté. On peut en outre avoir les extrémités N et C de la chaîne d'un même côté, ou bien de part et d'autre de la membrane (et dans des dispositions opposées).

Ces protéines possèdent un système d'aiguillage vers le réticulum identique à celles étudiées plus haut ; le début de leur histoire est donc exactement semblable. Comment se fait-il cependant que ces molécules ne soient pas libérées dans la lumière du RR, mais restent associées à la bicouche qui le constitue et deviennent ainsi des protéines membranaires typiques ? Sans entrer dans les détails, en raison de la diversité des situations rencontrées, on peut dire que de longs segments hydrophobes internes, le long de la chaîne polypeptidique, fonctionnent comme autant de **séquences d'ancrage** membranaire (ou **séquences topogéniques**) ; lors de la synthèse de la protéine par le ribosome, celles-ci l'enchâssent progressivement dans la bicouche, tout en disposant les domaines hydrophiles de part et d'autre. À la différence de la séquence-signal hydrophobe vue plus haut, ces séquences ne subissent évidemment pas de phénomène de clivage par une peptidase (voir *figure* 9.10).

Les modifications par glycosylation, qui ont été décrites plus haut pour les protéines sécrétées, sont également valables pour ces protéines membranaires ; on doit ici souligner un point important : seuls les domaines (ou boucles) tournés vers la lumière du réticulum rugueux pourront être glycosylés, pour les raisons déjà invoquées. On comprend comment ce processus accentue le phénomène de polarisation structurale de la membrane au niveau de ses protéines intrinsèques, dont la position précise est déterminée directement par le mode de synthèse. C'est dans le réticulum que commence en fait à se mettre en place le revêtement polysaccharidique (le manteau) que l'on trouve au niveau de la membrane cytoplasmique, tourné cette fois-ci vers l'extérieur de la cellule. L'inversion apparente de polarité (intérieur → exté-

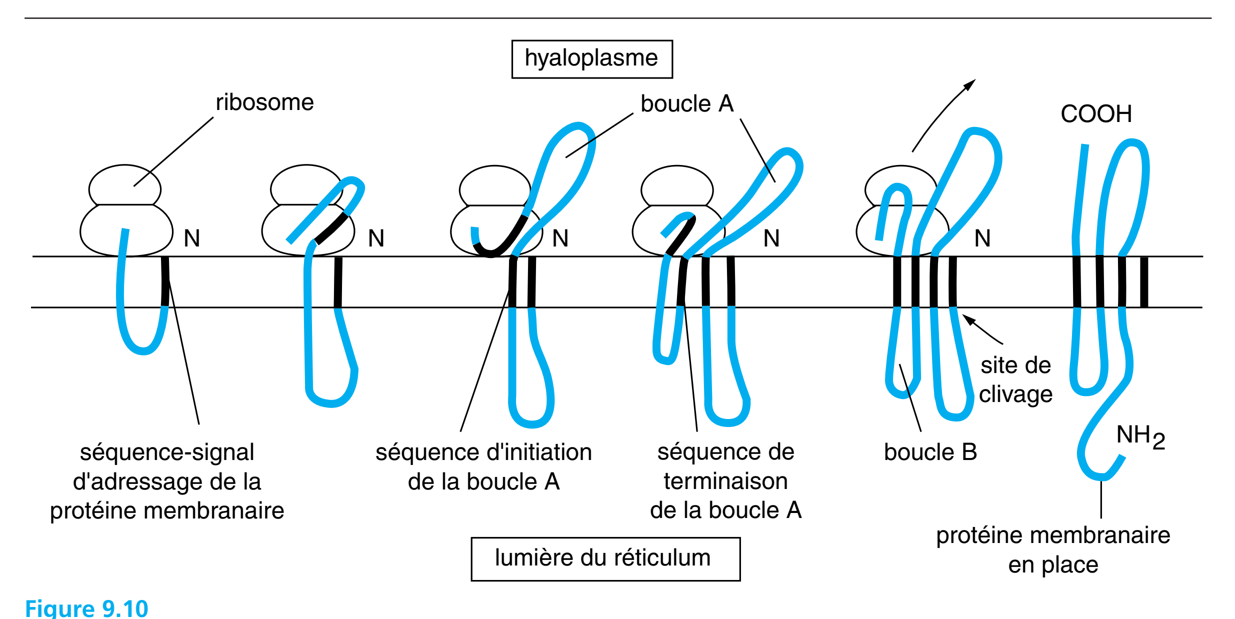


Figure 9.10

Principe simplifié de l'incorporation des protéines aux membranes du réticulum rugueux

Ce processus met en jeu deux types de séquences hydrophobes alternées (dites d'ancrage), dont l'une sert à l'initiation du transfert, et l'autre à la terminaison (exemple d'une protéine intrinsèque à trois traversées hydrophobes). Au cours de l'injection de la chaîne polypeptidique à travers la membrane, plusieurs domaines (boucles) situés dans le hyaloplasme ou dans la lumière, sont ainsi mis en place. Pour plus de clarté, l'ARNm n'est pas représenté.

rieur) est, comme on le verra, simplement due au phénomène d'exocytose : il y a **équivalence topologique** entre les espaces constitués par la lumière d'une vésicule et le milieu extracellulaire.

L'étude de la mise en place des protéines membranaires des Virus à enveloppe, qui bourgeonnent à partir de la membrane plasmique des cellules animales, a permis de bien comprendre les mécanismes mis en jeu dans ce système. En effet, peu de temps après le début de l'infection virale, toute la machinerie cellulaire est mise au service du génome viral et elle ne fabrique plus que des constituants codés par celui-ci (voir chapitre 15). Comme les protéines du virion sont généralement en nombre très réduit, ceci facilite considérablement l'analyse expérimentale, surtout lorsqu'on procède à des marquages radioactifs à partir de ce moment-là. Parmi les protéines virales, certaines resteront dans le hyaloplasme, mais d'autres transiteront à travers le réticulum endoplasmique rugueux, grâce aux mécanismes qu'on vient de décrire. Dans tous les cas, situation normale ou infection virale, ces protéines membranaires se retrouveront dans les vésicules et les saccules golgiens puis seront incorporées finalement dans la membrane cytoplasmique après exocytose.

2.5.2. Passage des protéines dans l'appareil de Golgi. Leurs destinations finales

Les expériences autoradiographiques montrent que toutes les protéines fabriquées dans le RR gagnent, dans un deuxième temps (en 5-10 minutes), un autre organite unimembranaire que nous analyserons plus tard : l'**appareil de Golgi**. Le passage de l'un à l'autre s'effectue grâce à des vésicules de 100 nm de diamètre environ, qui bourgeonnent à partir des membranes du RR et fusionnent avec des éléments proches de l'appareil de Golgi. Ces vésicules emportent non seulement une cargaison de protéines solubles contenue dans leur lumière, mais aussi des protéines et des lipides membranaires propres au RR ; compte tenu de leur position entre les deux organites, elles portent le nom de **vésicules de transition**. La microscopie électronique montre que ces vésicules sont recouvertes, du côté hyaloplasmique, d'un revêtement protéique épais d'une dizaine de nm. La composition de ce manteau commence à être connue, et elle diffère du revêtement géométrique de clathrine dont il a été question lors de l'étude de l'endocytose (voir chapitres 6 et 7), et dont on reparlera plus loin.

Les protéines et les lipides qui suivent cette voie ont quatre destinations finales possibles, en plus du fait qu'ils entreront momentanément dans la constitution de l'appareil de Golgi. Chez les cellules animales, les protéines solubles sont amenées :

1) soit à être émises à l'extérieur de la cellule par **exocytose** : ce sont les protéines sécrétées analysées un peu plus haut ;
2) soit à être incluses dans la lumière des **lysosomes**, organites déjà étudiés dans le chapitre 7.

Les lipides et les protéines membranaires feront partie :

1) soit de la membrane plasmique, après l'ultime phénomène de fusion des membranes des vésicules de sécrétion avec celle-ci ;
2) soit de la membrane limitante des lysosomes.

Dans le cas des cellules végétales, les choses sont un peu différentes ; on a vu que le compartiment lysosomal avait pour équivalent la **vacuole**, souvent unique et dont la taille était considérable dans les cellules différenciées (voir chapitre 7). La vacuole est ici un compartiment terminal, au même titre que le milieu extérieur chez les cellules animales ; il existe un trafic intense de vésicules, issues de l'appareil de Golgi, qui fusionnent avec elle et déversent leur contenu dans sa lumière.

Nous verrons qu'en réalité, lors de leur passage à travers l'appareil de Golgi, tous les constituants protéiques et lipidiques subissent de nombreuses modifications chimiques, de telle sorte que les produits finaux n'ont souvent pas grand chose à voir avec leur état initial à l'entrée de ce système complexe. On parlera à ce sujet de **maturation post-traductionnelle** des protéines.

2.5.3. Rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique. Le maintien de son identité

Le passage de matériel d'un compartiment à un autre au moyen de vésicules tend naturellement à une homogénéisation de leurs compositions chimiques. Ceci est vrai tout au long du flux membranaire que l'on vient d'annoncer, qui part du RR et se termine à la membrane plasmique ; et pourtant, tous ces systèmes membranaires conservent leur originalité structurale et physiologique. Quelques éléments de réponse à cette question du maintien de l'identité d'un compartiment dynamique sont fournis par l'analyse de plusieurs protéines caractéristiques du RR, pour lesquelles on a montré l'existence d'un phénomène de **rétention active**. Toutes ces protéines : récepteurs de la PRS, de la séquence-signal…, enzymes de la membrane ou de la lumière…, doivent y rester étroitement associées pour y fonctionner et lui permettre d'assurer son rôle spécifique (protéines résidentes). Bien que fabriquées par le RR lui-même, elles ne doivent donc pas participer au flux unidirectionnel qui entraîne normalement les protéines vers les destinations finales annoncées plus haut.

La plupart des protéines solubles retenues possèdent en fait une séquence identique de type : Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL, dans la nomenclature à une lettre des acides aminés) en position C-terminale. Son rôle est démontré de la façon suivante : 1) des protéines mutantes qui en sont dépourvues sont sécrétées au lieu d'être retenues dans le RR ; 2) à l'inverse, des protéines sécrétées modifiées par ajout de cette séquence, grâce au génie génétique, sont retenues dans le RR. Cette séquence est reconnue par un récepteur spécifique du RR, qui a été identifié et purifié et dont le fonctionnement est le suivant. Il existe en fait une légère «fuite» de toutes les protéines du RR vers le Golgi (y compris le récepteur lui-même) ; mais ce dernier est ensuite renvoyé vers le RR, chargé des protéines résidentes de ce compartiment, au moyen de petites vésicules. Ce mouvement de vésicules et de protéines, opposé au flux général (ou antérograde) de la sécrétion, est dit «rétrograde» ; voir la *figure* 9.20.

De même, des mécanismes particuliers de rétention doivent empêcher la diffusion latérale de certaines protéines caractéristiques du RR vers le RL (et inversement), condition nécessaire au maintien de leur individualité morphologique et fonctionnelle ; la nature des signaux mis en œuvre reste inconnue.

2.6. Rôle du réticulum lisse dans la synthèse des lipides. L'élaboration des membranes cellulaires chez les cellules animales

2.6.1. Synthèse des lipides membranaires

En raison de leurs propriétés physicochimiques remarquables et de leur insolubilité en phase aqueuse, tous les lipides membranaires (glycérophospholipides, glycolipides, sphingolipides, cholestérol…), sont soit synthétisés sur des membranes

préexistantes, soit incorporés en leur sein immédiatement après leur synthèse. De cette façon, les membranes n'apparaissent jamais *de novo* au sein des cellules, mais il y a simplement augmentation de la surface de celles qui préexistent. Dans les cellules bactériennes, les enzymes de synthèse de ces lipides sont localisées dans la membrane plasmique ; chez les Eucaryotes, cette activité est assurée soit par le RL, dans le cas des cellules animales, soit par les chloroplastes, chez les Végétaux verts. Ces membranes extensibles et qui « s'autofabriquent » sont qualifiées de **biogéniques**.

La synthèse de la phosphatidyl-choline, principal phospholipide des cellules animales, peut être donnée à titre d'exemple. Toutes les enzymes intervenant dans cette synthèse font partie intégrante (**protéines intrinsèques**) de la membrane du RL, leurs sites actifs étant tournés vers le hyaloplasme. C'est de là que viennent en effet tous les substrats entrant dans la fabrication du lipide : les acides gras, sous forme d'acyl-CoA (forme hydrosoluble de ces molécules), le glycérol, sous forme de glycérol-phosphate et la choline, sous forme de CDP-choline ; tous ces précurseurs sont des molécules activées du métabolisme intermédiaire. Les acyl-CoA sont tout d'abord pris en charge par des enzymes qui fixent les acides gras au glycérol-phosphate tout en libérant les CoA (acylation) ; ces étapes sont cruciales car elles conduisent à l'introduction des acides gras dans la couche externe (hyaloplasmique) de la bicouche du RL et donc à l'augmentation de sa surface (voir *figure* 9.11). La suite de la synthèse consiste à ajouter au diacylglycérol la tête hydrophile du lipide (ici, la choline). La fabrication de la phosphatidyl-éthanolamine est basée sur le même principe : une synthèse sur une interface.

Il faut cependant bien comprendre que, à mesure que les enzymes mises en jeu fonctionnent, seule la couche externe du RL s'enrichit car le basculement de tels lipides (**flip-flop**) est spontanément impossible vers la couche interne. Pour éviter un déséquilibre entre les deux surfaces de la bicouche, on doit donc faire intervenir une protéine porteuse appropriée, déjà présentée dans le chapitre 5. On connaît un facteur de translocation spécifique (ou « **flippase** ») de la phosphatidyl-choline, mais il n'en existe pas pour la phosphatidyl-sérine et pour la phosphatidyl-éthanolamine, qui restent ainsi confinées sur la face externe du RL. La distribution asymétrique des lipides membranaires s'explique ainsi dès l'origine de l'élaboration des membranes, au niveau du RL.

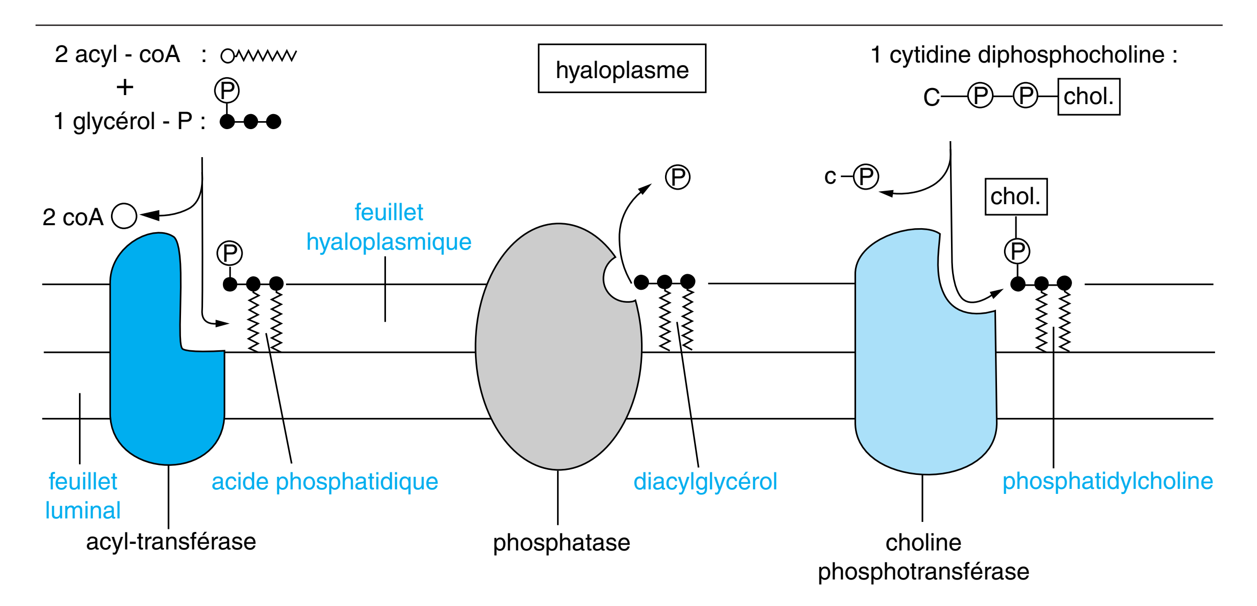


Figure 9.11

Synthèse des phospholipides membranaires : exemple de la phosphatidylcholine

Les membranes du réticulum lisse contiennent diverses enzymes (protéines intrinsèques) dont les sites actifs sont tournés vers le hyaloplasme. Elles mettent progressivement en place ces lipides au sein de la bicouche, au cours des différentes étapes de leur synthèse.

Grâce à certaines de ses enzymes, le RL est aussi le lieu de l'élongation et de la désaturation des acides gras ; par exemple, l'acide palmitique (C16), fabriqué dans le hyaloplasme, est allongé en acide stéarique (C18), puis désaturé en acide oléique. Cette dernière réaction met en jeu un intermédiaire hydroxylé (-HCOH-) formé grâce à une courte chaîne de transport d'électrons membranaire : NADH (donneur d'électrons de haute énergie), NADH oxydase à FAD et cytochrome b_5 ; ces deux protéines intrinsèques ont leurs sites actifs en regard du hyaloplasme. Une deuxième chaîne de ce type, mettant en jeu le NADPH, une NADPH oxydase à FAD et le cytochrome P_{450}, permet, quant à elle, d'hydroxyler une grande variété de substrats. Parmi ceux-ci, il faut citer le cholestérol et tous les stéroïdes hormonaux qui en dérivent, ainsi que les composés faisant l'objet d'une détoxification (voir plus loin). Ces deux chaînes d'oxydoréduction typiques du RL utilisent O_2 comme accepteur d'électrons, mais elles ne produisent pas d'ATP, à la différence de celles trouvées dans les mitochondries (voir chapitre 10).

Le RL est aussi le lieu de synthèse du cholestérol (à partir d'acétate) et du céramide ; bien que fabriqués sur la face externe eux aussi, ces composés s'équilibrent spontanément sur les deux faces (par basculement), en raison de la présence d'un domaine polaire très réduit. Chez les Vertébrés, le lieu essentiel de synthèse du cholestérol est le foie.

2.6.2. Échanges de lipides avec les autres compartiments

Le RL, lieu quasi unique de synthèse des lipides membranaires dans la cellule animale, les exporte vers tous les autres compartiments de deux façons très différentes. Étant en continuité physique avec le RR, celui-ci reçoit ces lipides par le simple fait de leur mobilité latérale et de la fluidité membranaire ; l'importance de ceci sera rappelée plus loin. Le transport par vésicules assurera ensuite le passage de ces molécules à tous les compartiments situés en aval du RR. C'est ainsi que le céramide passe vers l'appareil de Golgi où il servira de substrat pour former la **sphingomyéline** (par acquisition d'une tête de choline, provenant de la phosphatidyl-choline), ou bien les divers **sphingoglycolipides** (après glycosylation) ; ces composés sont donc des produits tardifs du métabolisme des lipides membranaires. Les enzymes membranaires mises en jeu ayant leur site actif tourné vers la lumière, ces lipides sont modifiés sur la seule face interne des saccules golgiens. C'est également cette voie qui fournit en permanence du cholestérol à la membrane plasmique, après exocytose des vésicules de sécrétion (voie constitutive).

Divers phospholipides fabriqués au niveau du RL partent aussi vers les mitochondries et les peroxysomes, où ils participent à la formation des membranes, bien que ces organites soient en dehors du flux membranaire qu'on vient d'évoquer. Le passage à travers le hyaloplasme implique des protéines hydrosolubles capables d'extraire (de la couche externe du RL) et d'emporter une seule catégorie de lipides ; ces **protéines d'échange de phospholipides** les délivrent ensuite à la couche externe de la membrane des organites en question, où ils font éventuellement l'objet de modifications chimiques ultérieures (voir *figure* 9.12). De même, la transformation du cholestérol en hormones stéroïdes, qui a lieu dans les glandes corticosurrénales, les ovaires ou les testicules, implique diverses réactions se déroulant dans les mitochondries ; les échanges entre le RL et ces organites sont assurés par des protéines transporteuses du cholestérol (ou de ses dérivés), fonctionnellement équivalentes aux précédentes.

Dans les tissus photosynthétiques, les chloroplastes fabriquent non seulement tous les acides

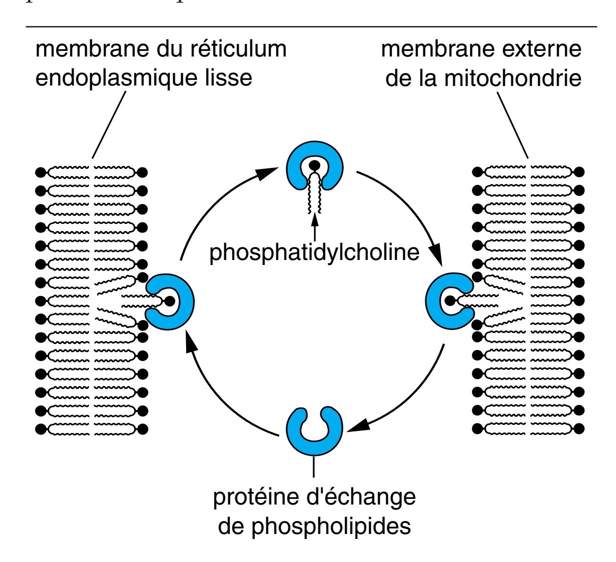


Figure 9.12

Échange de phospholipides entre organites

Le compartiment membranaire donneur est en général le réticulum endoplasmique lisse, qui fournit ici des phospholipides aux mitochondries grâce à une protéine porteuse appropriée. Une telle molécule porteuse ne transporte qu'une seule molécule de phosphatidylcholine.

gras cellulaires, mais également tous les lipides membranaires, y compris les glycolipides caractéristiques des thylakoïdes.

2.6.3. Élaboration de membranes par le réticulum endoplasmique

Si l'on envisage le réticulum endoplasmique dans son ensemble, on conclut qu'il constitue une «machine à fabriquer de la membrane» : par sa composante RR, il introduit des protéines dans une bicouche phospholipidique, par sa composante RL il produit cette même bicouche. Comme ces deux compartiments sont en continuité physique et que la bicouche qui les constitue est très fluide, en raison de la richesse en acides gras courts et insaturés de ses phospholipides et de sa relative pauvreté en cholestérol, les protéines et les lipides se rejoignent et se mélangent aisément pour organiser une membrane biologique typique. Que devient cette membrane sans cesse élaborée, alors que la surface globale du réticulum reste visiblement inchangée ? La réponse a déjà été fournie lors de l'étude du passage des protéines sécrétées vers l'appareil de Golgi : c'est sous la forme des vésicules de transition que la membrane est transférée à ce nouvel organite. Nous verrons plus loin que si celui-ci s'enrichit à son tour en surface membranaire, il en perd également en bourgeonnant d'autres vésicules, au profit essentiellement de la membrane plasmique. Il existe en fait un flux permanent de membrane partant du réticulum endoplasmique et atteignant la surface cellulaire ; nous en reparlerons en fin de chapitre.

2.6.4. Autres fonctions du réticulum lisse : la détoxification

Le RL assure, on l'a vu, diverses modifications chimiques affectant des molécules endogènes ; il peut aussi modifier de nombreuses molécules provenant du milieu extérieur, absorbées par les cellules ou les organismes. Parmi celles-ci, on compte des substances artificielles produites par l'industrie : pesticides (insecticides, désherbants), colorants, additifs alimentaires, conservateurs, hydrocarbures aromatiques (goudrons provenant, entre autres, de la fumée de cigarette), médicaments… Ces composés, souvent de nature hydrophobe, sont naturellement toxiques pour l'organisme car ils ne peuvent pas être éliminés et ils tendent à s'accumuler dans les membranes cellulaires ou les cellules riches en lipides (adipocytes). Chez les Vertébrés, on a montré que divers moyens d'élimination existent cependant ; ils sont assurés par des enzymes du RL, qui permettent la **détoxification** de ces molécules au sein d'organes tels que le foie, les reins ou les intestins. Le principe est l'hydroxylation, mécanisme mis en jeu pour la désaturation normale des acides gras ou la formation des hormones stéroïdes. Grâce à l'O_2, à une NADPH oxydase et au cytochrome P_{450}, des groupements OH sont greffés sur les molécules hydrophobes, ce qui les rend plus hydrosolubles ou permet leur accrochage covalent à des composés eux-mêmes polaires (acide glycuronique ou groupements sulfate, par exemple). De cette façon, des produits toxiques sont facilement éliminés par la voie sanguine et l'excrétion urinaire.

Lorsque des injections répétées de médicaments de type barbiturique sont faites chez le rat, on observe une augmentation significative de la surface du RL des hépatocytes (x 2 en 4 jours) ainsi qu'une augmentation de l'activité spécifique (x 4, par unité de surface) des seules enzymes associées à la détoxification, citées plus haut. Ce phénomène conduit évidemment à l'élimination du composé injecté, mais aussi à celle de tous les autres composés susceptibles de subir une hydroxylation détoxifiante. De nombreuses espèces moléculaires conduisent à des modifications semblables du RL.

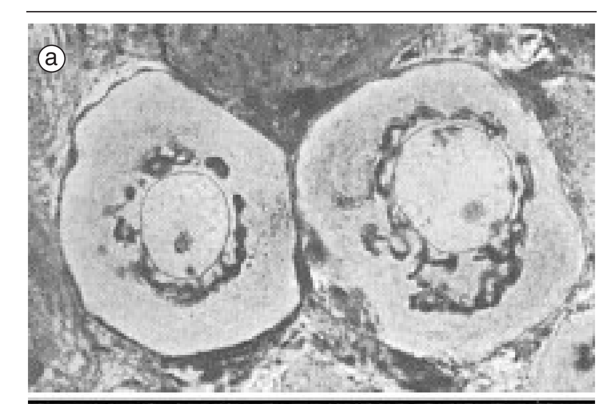
Ce système naturel de détoxification a malheureusement un inconvénient grave. Parmi les composés exogènes, certains (assez rares) ont une activité cancérigène directe car ils se lient à l'ADN et entraînent des mutations. De nombreux autres cependant, comme les benzopyrènes (trouvés dans les goudrons), sont neutres et peu réactifs en soi, mais ils deviennent des **cancérigènes** très puissants après une modification chimique consistant en une hydroxylation. Or, cette «activation métabolique» est catalysée par des enzymes normalement trouvées dans les cellules, qui ne sont rien d'autre que celles présentes dans le RL et chargées de détoxifier les produits nocifs. Ainsi, de façon paradoxale, la voie de détoxification à P_{450} conduit à des composés chimiques encore plus dangereux que ceux qui sont entrés dans l'organisme ! La preuve directe du rôle du RL dans ce processus d'activation de molécules cancérigènes a été directement démontré *in vitro*, grâce à des microsomes lisses purifiés à partir d'hépatocytes.

3. RÔLE DE L'APPAREIL DE GOLGI DANS LA MATURATION DES PROTÉINES ET LA SYNTHÈSE DES POLYSACCHARIDES

3.1. Organisation de l'appareil de Golgi

3.1.1. Observation en microscopie photonique

En 1898, au moyen d'une coloration à l'acide osmique ou au nitrate d'argent, C. Golgi mettait en évidence dans plusieurs types cellulaires (corps cellulaires des neurones et cellules pancréatiques), des structures en forme d'écailles ou de croissants, plus ou moins anastomosées et présentant deux zones d'affinité différente pour le colorant (l'argent ou l'osmium réduits) (voir *figure* 9.13). L'ensemble de ces structures, aujourd'hui appelées **dictyosomes**, constitue l'**appareil de Golgi** ; souvent présent dans toute la cellule, celui-ci est parfois localisé en un point précis, à proximité du noyau.



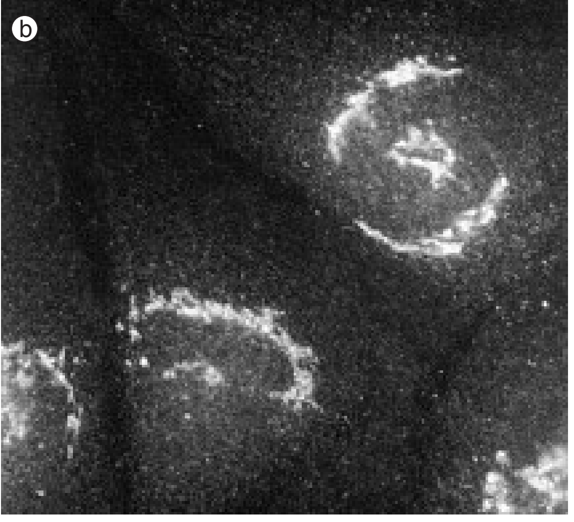


Figure 9.13

Aspect de l'appareil de Golgi dans des cellules animales

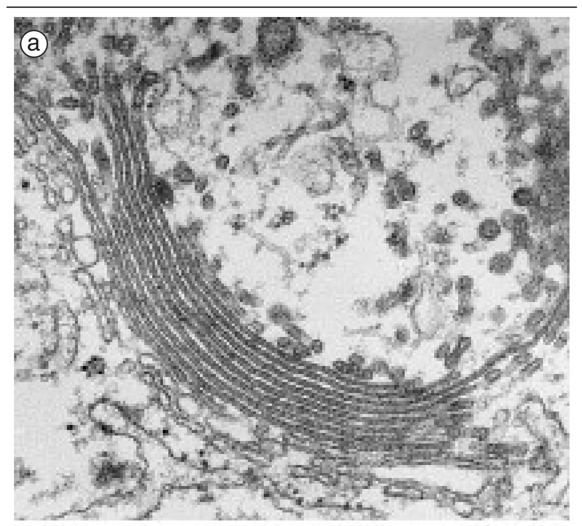
(a) Cellules nerveuses : microscopie photonique ; coloration de type imprégnation argentique. Les dictyosomes apparaissent sous la forme d'écailles plus ou moins réunies sous la forme d'un ruban parcourant la cellule. (Cliché Labo BG, Orsay). **(b)** Aspect en immunofluorescence dans des cellules animales en culture. (Cliché O. Martinez et B. Goud, Institut Curie, Paris).

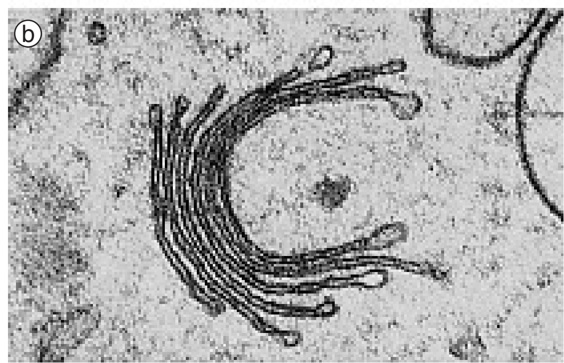
3.1.2. Observation en microscopie électronique

Comme pour le réticulum endoplasmique, seule la microscopie électronique a permis de voir qu'il s'agissait d'un constituant universel chez les Eucaryotes et de comprendre son organisation précise ; de même, ce compartiment est d'autant plus visible que les cellules étudiées sont des cellules sécrétrices et en intense activité.

Les coupes ultrafines montrent que cet organite se présente sous la forme de nombreux complexes apparemment discontinus, formés de piles de saccules unimembranaires lisses aplatis ; ces structures correspondent aux dictyosomes décrits en microscopie photonique. Cependant, ainsi que l'avait pressenti son découvreur, nous verrons que l'appareil de Golgi des cellules sécrétrices animales est un système continu remplissant le hyaloplasme cellulaire, sous la forme d'un long ruban tortueux. Un dictyosome est en général constitué de 5 à 10 saccules très aplatis, plus ou moins circulaires (de 1 à 3 µm de diamètre environ), de forme légèrement concave, et empilés les uns sur les autres ; une membrane de 6 à 7 nm d'épaisseur limite une cavité interne étroite de 5 à 10 nm. Le bord des saccules est légèrement renflé, crénelé, et il semble émettre de petites vésicules de 50 à 100 nm de diamètre ; une multitude de vésicules recouvertes de cette taille sont d'ailleurs observées à proximité immédiate des dictyosomes (voir *figure* 9.14). Dans le détail, on constate en fait que les sacs les plus extrêmes ne sont ni ressemblants entre eux, ni aux sacs médians, de sorte qu'un dictyosome est un système structuralement très polarisé. Par ailleurs, ces sacs sont en relation topographique étroite avec d'autres organites.

Chez les Animaux, les sacs de la face convexe entrent souvent en rapport avec le RR de la façon





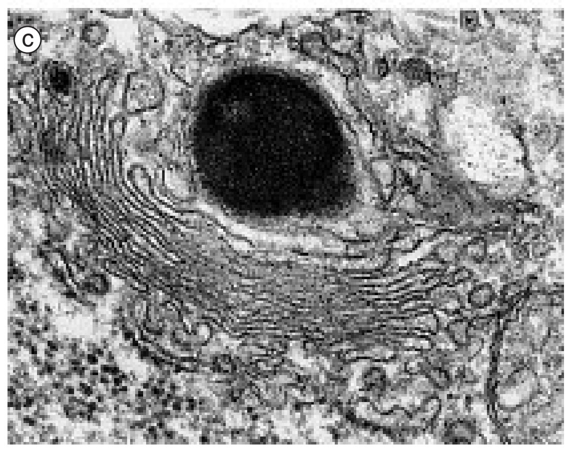


Figure 9.14

Aspect des dictyosomes golgiens en coupe transversale

Ces exemples sont pris : **(a)** dans une cellule animale ; **(b)** dans une cellule végétale ; **(c)** dans une cellule de Protiste. Coupes ultrafines observées en microscopie électronique.
Grossissement × 18 000. (Clichés Labo BG et BV, et R. Charret, Labo BC4, Orsay).

suivante : une nappe de réticulum est disposée parallèlement au premier saccule ; cette nappe ne possède pas de ribosomes sur la face qui est en vis-à-vis du dictyosome et elle semble bourgeonner (ou recevoir par fusion) de nombreuses petites vésicules, visibles dans l'espace séparant les deux organites (**vésicules de transition**). Le premier saccule golgien, souvent fenestré, semble lui aussi bourgeonner de nombreuses vésicules. Il faut bien se rendre compte que la cytologie ne donne que des images statiques des échanges apparents entre les structures : quand une vésicule rencontre une structure membranaire, on ne peut savoir s'il s'agit d'un phénomène de bourgeonnement de membrane ou de fusion de vésicule. Les deux mouvements sont opposés et seules des analyses dynamiques, physiologiques, permettent de savoir de quelle manière se déroulent les événements ; nous avons en fait déjà appris que le flux général se réalise unidirectionnellement, du réticulum vers l'appareil de Golgi. La face convexe d'un dictyosome, qui reçoit les vésicules de transition, est appelée **face de formation** ou **face cis** (voir *figure* 9.15).

Les sacs de la face opposée, concave, ont en général une forme plus irrégulière ; souvent plus gonflés que les précédents, ils émettent de grosses vésicules qui s'accumulent à proximité. Celles-ci ont un contenu de plus en plus opaque aux électrons à mesure qu'on s'éloigne du dernier saccule, cette caractéristique étant particulièrement marquée chez les cellules sécrétrices de protéines ; dans une cellule banale, comme l'hépatocyte, cette disposition est moins évidente. Cette face du dictyosome est appelée **face de maturation** ou **face trans** ; dans les cellules sécrétrices épithéliales, elle est généralement tournée vers la zone de la membrane plasmique à vocation sécrétrice, c'est-à-dire vers la lumière de la glande.

Le nombre de dictyosomes varie beaucoup d'un type cellulaire à l'autre. Il peut y en avoir plusieurs centaines dans certaines cellules spécialisées comme les cellules pancréatiques, les cellules caliciformes à mucus de l'épithélium intestinal (sécrétant les glycoprotéines qui en tapissent la paroi ; voir plus loin), ou bien les cellules des glandes muqueuses de l'escargot. Quand on examine de telles cellules en coupes épaisses (2-4 µm) sous des tensions très élevées (microscopie électronique à haut voltage), on constate en fait que les saccules de la face de formation des divers dictyosomes sont en continuité les uns avec les autres grâce à des tubules lisses, et que l'ensemble constitue un réseau cellulaire complexe en trois dimensions. Il n'en reste pas moins vrai que chaque dictyosome a

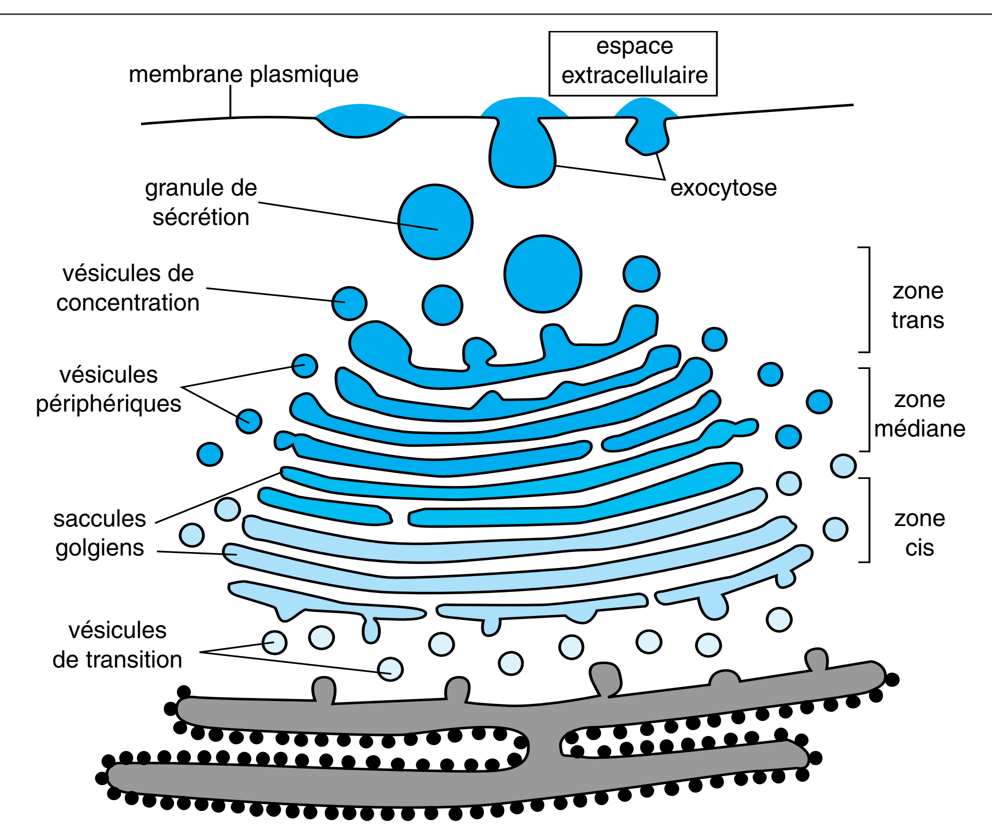


Figure 9.15

Organisation d'un dictyosome golgien

La structure polarisée du dictyosome apparaît à travers la distinction entre saccules cis, medium et trans, qui n'ont ni la même forme, ni la même composition chimique.
Noter la présence des nombreuses vésicules périphériques, qui font communiquer les saccules entre eux, et celle des vésicules de transition qui assurent le passage de molécules entre le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi. Dans le cas des cellules sécrétrices, la face trans est marquée par de volumineux grains de sécrétion.

une identité propre, caractérisée par sa polarité de structure. Celle-ci est renforcée par une polarité biochimique et enzymatique, comme le prouvent les tests de cytochimie et de cytoenzymologie :

– l'imprégnation osmique ne colore qu'un ou deux saccules de la face de formation (partie sombre du dictyosome vu en microscopie photonique par Golgi) ;
– les activités enzymatiques de type phosphatasique (nucléoside diphosphatase, phosphatase acide) sont pour la plupart rencontrées dans les saccules de la face de maturation ou le réseau transgolgien (voir plus loin) ;
– les protéines et les polysaccharides apparaissent plus concentrés dans les saccules de la face de maturation et les grosses vésicules de sécrétion ;
– l'épaisseur de la membrane des saccules augmente légèrement depuis la face cis (5-6 nm) jusqu'à la face trans (7-8 nm).

L'ensemble de ces analyses, complété par l'immunocytochimie (identification de protéines spécifiques), conduit à distinguer trois zones principales, du point de vue biochimique et physiologique, au sein d'un dictyosome : les **saccules cis**, les **saccules medium** et les **saccules trans** (parfois appelés **réseau transgolgien**).

Dans le cas des cellules végétales, les dictyosomes apparaissent le plus souvent épars, isolés et non associés en un appareil organisé ; ils sont parfois concentrés à proximité de la membrane plasmique. Leurs rapports avec le réticulum endoplasmique sont beaucoup moins nets que chez les

cellules animales ; ceci est mis en relation avec le fait que la sécrétion des protéines y est un phénomène relativement peu important, car ne concernant que quelques protéines pariétales.

3.2. Fonctions générales de l'appareil de Golgi. La maturation des protéines sécrétées, membranaires et lysosomales

3.2.1. Approche fonctionnelle

L'analyse fonctionnelle de l'appareil de Golgi est difficile en raison de la complexité de sa structure et de ses liens étroits avec d'autres compartiments cellulaires. Le fractionnement cellulaire détruit presque inévitablement l'organisation polarisée à laquelle ses fonctions sont associées ; il est cependant possible, si le broyage est très modéré, de récupérer quelques empilements intacts de saccules. Bien que des microsomes lisses puissent apparaître à la suite de sa désagrégation après homogénéisation, ils sont souvent mélangés avec d'autres qui ont des origines très diverses. Dans le meilleur des cas, à partir de cellules riches en dictyosomes, il est possible d'établir une liste caractéristique des enzymes golgiennes, mais on ne peut les attribuer à des saccules précis. On a ainsi également montré que la composition globale en lipides des membranes golgiennes est intermédiaire entre celle du réticulum endoplasmique et celle de la membrane plasmique. Les approches privilégiées restent la cytochimie et la cytoenzymologie, mais surtout l'autoradiographie appliquée à des expériences de type *pulse-chase* : l'incorporation de sucres radioactifs variés, de sels minéraux (sulfates, phosphates) a permis de reconstituer les séquences des événements biochimiques et de transport effectués en son sein.

3.2.2. Fonctions générales de l'appareil de Golgi

Ces fonctions sont suggérées à la fois par ses rapports structuraux avec les autres constituants cellulaires (RR et vésicules de sécrétion) et par son abondance dans certaines cellules spécialisées dans la production et la sécrétion de protéines ou de polysaccharides, comme on l'a déjà signalé. De nombreuses modifications des protéines en transit (**maturation**) ont lieu dans les saccules golgiens ; elles sont qualifiées de post-traductionnelles car elles affectent des chaînes polypeptidiques complètement terminées, leur synthèse proprement dite s'étant déroulée dans le RR. Nous verrons plus loin comment elles permettent aux protéines d'acquérir leur conformation et leurs propriétés biologiques définitives.

Outre cette fonction de sécrétion et de stockage, on a récemment mis en évidence un rôle général beaucoup plus subtil et difficile à appréhender, qui consiste à « marquer » certaines protéines de façon à ce qu'elles se dirigent précisément vers un compartiment donné ; ce marquage moléculaire consiste en des modifications chimiques de type glycosylation et phosphorylation, qui servent de signal d'adressage. L'appareil de Golgi règle donc le trafic d'une partie des protéines dans la cellule (rôle de **centre de tri**). Trois destinations sont possibles pour celles qui le traversent : le milieu extracellulaire, comme on l'a déjà dit, la membrane plasmique et les lysosomes primaires. Il a enfin une position clef dans le cytoplasme car il recycle aussi de nombreuses protéines membranaires, y compris celles issues de la membrane plasmique ; les bases du mécanisme sont mal connues.

Le transport des protéines et des lipides membranaires le long des dictyosomes s'effectue au moyen des vésicules recouvertes qui bourgeonnent à la périphérie d'un saccule et fusionnent avec le suivant, et ainsi de suite le long de l'empilement. Ceci implique que ces vésicules soient programmées pour fusionner avec une cible membranaire unique ; des systèmes hypothétiques complexes de signaux de surface et de récepteurs ont été imaginés pour rendre compte de ces processus. Malgré des échanges constants de matériel avec les saccules situés en amont et en aval, ceux-ci conservent leur taille et leur forme caractéristique, et surtout leur spécificité physiologique ; la question est de savoir comment sont retenues sur place ou recyclées les protéines structurales ou enzymatiques de tel ou tel saccule golgien. Le maintien de la structure d'un dictyosome est donc le résultat d'un équilibre dynamique très subtil. On connaît des drogues qui perturbent cet équilibre et qui conduisent à la disparition rapide et complète, mais réversible, de tout l'appareil de Golgi ; ces composés constituent évidemment un outil irremplaçable pour l'étude de ce compartiment.

3.2.3. Phénomènes de sécrétion. Exocytose

Les vésicules qui quittent l'appareil de Golgi au niveau du réseau trans, et qui participent au phé-

nomène de sécrétion, peuvent être classées en deux catégories bien distinctes par leur taille, leur mode de formation, le type de molécules transportées et le type de cellules où on les rencontre. Dans les deux cas, cependant, on verra que ces vésicules interviennent dans la production de membrane pour la surface cellulaire.

On admet que dans toutes les cellules animales ou végétales, spécialisées dans la sécrétion ou non, existe une voie de sécrétion impliquant des vésicules émises de façon continue par les dictyosomes ; cette **voie** est dite **constitutive**. Ces vésicules initialement recouvertes d'un revêtement non formé de clathrine sont nombreuses, de petite taille et elles fusionnent immédiatement avec la membrane plasmique. Lors de ce processus de fusion, la lumière de la vésicule entre en contact avec le milieu extérieur, où son contenu est libéré, et la face interne de sa membrane devient la face externe de la membrane plasmique : c'est l'**exocytose** (voir chapitre 6). L'asymétrie membranaire de la vésicule est donc directement à l'origine de celle observée pour la membrane plasmique. Par exemple, tous les groupements oligo- ou polysaccharidiques portés par les protéines ou les lipides membranaires, tournés vers la lumière des vésicules, se retrouvent finalement dirigés vers l'extérieur de la cellule (face extracellulaire de la membrane plasmique). Il faut donc bien comprendre que l'origine de la membrane plasmique est très profonde dans la cellule (le réticulum endoplasmique), et que sa composition et ses propriétés ont été progressivement acquises au cours du transit dans les saccules golgiens.

La fonction de la voie constitutive est d'apporter en permanence à la membrane plasmique des constituants qui lui sont propres, tels que des glycoprotéines (à rôle de récepteurs, de transporteurs divers…), des lipides ou du cholestérol, de façon à assurer son renouvellement et compenser les phénomènes d'endocytose (voir chapitre 7). C'est également cette voie qui permet, par exemple, la sécrétion continue des protéines sériques par les hépatocytes, du collagène par les fibroblastes, et l'apport à la surface apicale de protéines fortement glycosylées (constituant le manteau cellulaire) dans les entérocytes.

Chez les cellules sécrétrices spécialisées dont on a parlé plus haut, il existe, en plus de la voie précédente, une voie conduisant à l'accumulation et à la mise en réserve provisoire de produits de sécrétion au sein de grosses vésicules dont la formation implique initialement la clathrine (**granules de sécrétion**). Leur contenu, en général très concentré en protéines, et dont la structure apparaît parfois pseudocristalline, n'est sécrété que si la cellule a reçu un stimulus particulier, de nature nerveuse ou hormonale. On parle alors de sécrétion intermittente et de **voie de sécrétion contrôlée**. Dans le cas des cellules exocrines du pancréas, par exemple, on sait que la sécrétion des enzymes digestives est provoquée par des facteurs tels que l'acétylcholine et diverses hormones peptidiques (gastrine, sécrétine, cholécystokinine…) fabriquées par l'estomac ou l'intestin, et qui se fixent sur des **récepteurs** portés par leur membrane plasmique. Ces derniers sont à l'origine, à l'intérieur de la cellule, d'une cascade complexe d'événements dont l'expression finale est l'exocytose (transduction d'un signal ; voir chapitre 13). De nombreux exemples de production d'hormones polypeptidiques : insuline, glucagon, hormones hypophysaires…, pourraient aussi illustrer cette sécrétion contrôlée (voir encart suivant). La synthèse et la libération de l'histamine (petite molécule liée à des protéoglycanes) par les mastocytes ont été traitées dans le chapitre 6.

La migration des vésicules ou des granules de sécrétion vers la surface cellulaire et leur décharge par exocytose sont dépendantes d'un grand nombre de facteurs, comme l'ont montré divers inhibiteurs. La nécessité d'une source d'énergie (ATP) a ainsi été démontrée, et l'intervention d'éléments du cytosquelette : microtubules et microfilaments (voir chapitre 11), a pu être établie. L'utilisation de cytochalasine, par exemple, entraîne le blocage de l'exocytose et l'accumulation de vésicules de sécrétion dans le hyaloplasme. Le rôle des ions Ca^{2+} dans le contrôle de ces mécanismes est aussi démontré. La question majeure posée dans le cas des cellules possédant les deux voies de sécrétion est celle de la répartition des protéines solubles, au sein du réseau trans, dans deux types de vésicules dont les propriétés sont très différentes ; quelques éléments de réponse seront donnés un peu plus loin.

3.3. Glycosylation post-traductionnelle des protéines : la synthèse des glycoprotéines et des protéoglycanes

De très nombreuses protéines sécrétées sont glycosylées à des degrés divers. L'étude des pro-

ENCART BIOMÉDICAL

Nanisme et gigantisme : des dysfonctionnements de l'hypophyse

Cette petite glande est située sous l'hypothalamus ; son lobe antérieur, l'adénohypophyse, sécrète six hormones protéiques qui influent sur plusieurs organes, en particulier des glandes endocrines. L'hormone de croissance (ou somatotrophine) et la prolactine agissent sur des cibles non endocrines, tandis que la thyréotrophine, la corticotrophine, les hormones lutéinisante et folliculostimulante ont pour cibles la thyroïde, la corticosurrénale et les gonades.

L'hormone de croissance (GH) est une protéine de 191 acides aminés codée par un gène situé, chez l'Homme, sur le chromosome 17. Comme toute protéine sécrétée, elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur plus grand. C'est une hormone anabolisante favorisant la dégradation des graisses et la synthèse des protéines dans les cellules, grâce à des facteurs dont elle stimule la sécrétion par le foie : les somatomédines (ou Insulin like Growth Factors : IGF). Elle intervient aussi dans les divisions cellulaires, via les IGF, et agit principalement sur la croissance des os et des muscles, et donc sur la taille finale des individus. Le nanisme et le gigantisme sont des anomalies dues à une sécrétion anormale de la GH.

Le nanisme peut résulter de plusieurs causes, parmi lesquelles : une déficience de la GH (absence, ou forme anormale), une synthèse insuffisante des IGF ou un défaut des récepteurs de la GH dans les cellules cibles. Une insuffisance précoce de sécrétion de toutes les hormones hypophysaires (congénitale ou due à une tumeur) est à l'origine de la plupart des nanismes. Dans ce cas, la vitesse de croissance de tous les organes est ralentie, mais le développement du corps reste harmonieux. Les enfants présentant un retard marqué de croissance sont actuellement traités par des injections de GH humaine recombinante, issue de Bactéries.

L'hypersécrétion de la GH pendant l'enfance conduit au gigantisme (jusqu'à 2,40 m), avec des membres bien proportionnés. Si elle se produit chez l'adulte, elle conduit à l'acromégalie, une hypertrophie des os du visage et des extrémités. La cause en est souvent une tumeur, et la seule thérapie est l'ablation chirurgicale.

cessus qui conduisent à l'accrochage des sucres sur les chaînes polypeptidiques a été en particulier conduite de manière détaillée sur les **cellules caliciformes à mucus** (intestin grêle des Mammifères), connues pour produire en abondance des protéines très riches en sucres, à consistance visqueuse en solution, et nommées **mucoprotéines** (voir *figure* 9.16). Le principe des expériences est celui du *pulse-chase*, mais utilisant cette fois-ci des précurseurs radioactifs de polysaccharides, à savoir des sucres simples ou des dérivés de sucres, que l'on trouve dans les motifs glycosylés des protéines. Les résultats obtenus avec les sucres suivants : mannose, galactose, fucose, N-acétyl-glucosamine, acide N-acétyl-neuraminique (acide sialique), montrent que deux compartiments sont mis en jeu dans les glycosylations.

Au niveau du RR ou des microsomes rugueux purifiés, comme le montrent les autoradiographies ou les dosages pratiqués après un *pulse*, on a déjà vu que seuls des résidus glucose, mannose ou acétyl-glucosamine sont accrochés aux protéines (N-glycosylation) ; à partir de là, le trajet au cours de la chasse est le même que celui décrit précédemment pour les chaînes polypeptidiques seules. Par contre, pour le galactose, le fucose ou l'acide N-acétyl-neuraminique, c'est au niveau de l'appareil de Golgi seulement qu'on détecte les premiers signes de marquage. De la même façon, on peut montrer que d'autres modifications des protéines, telles que la sulfatation ou la phosphorylation, ont lieu dans les dictyosomes, et qu'elles se poursuivent dans les vésicules de sécrétion.

La conclusion de ces expériences est que la synthèse des protéines sécrétées est un processus long et complexe, mettant en jeu plusieurs compartiments cellulaires collaborant à une même fonction. La notion de compartimentation en biologie cellulaire ne doit pas être conçue de façon étroite et statique, car on est amené à observer que certaines fonctions ne sont pas l'apanage d'organites particuliers. Les mécanismes de glycosylation des protéines transitant à travers l'appareil de Golgi sont extrêmement complexes et il est nécessaire de beaucoup simplifier les choses ; une première distinction doit être faite entre les N- et les O-glycosy-

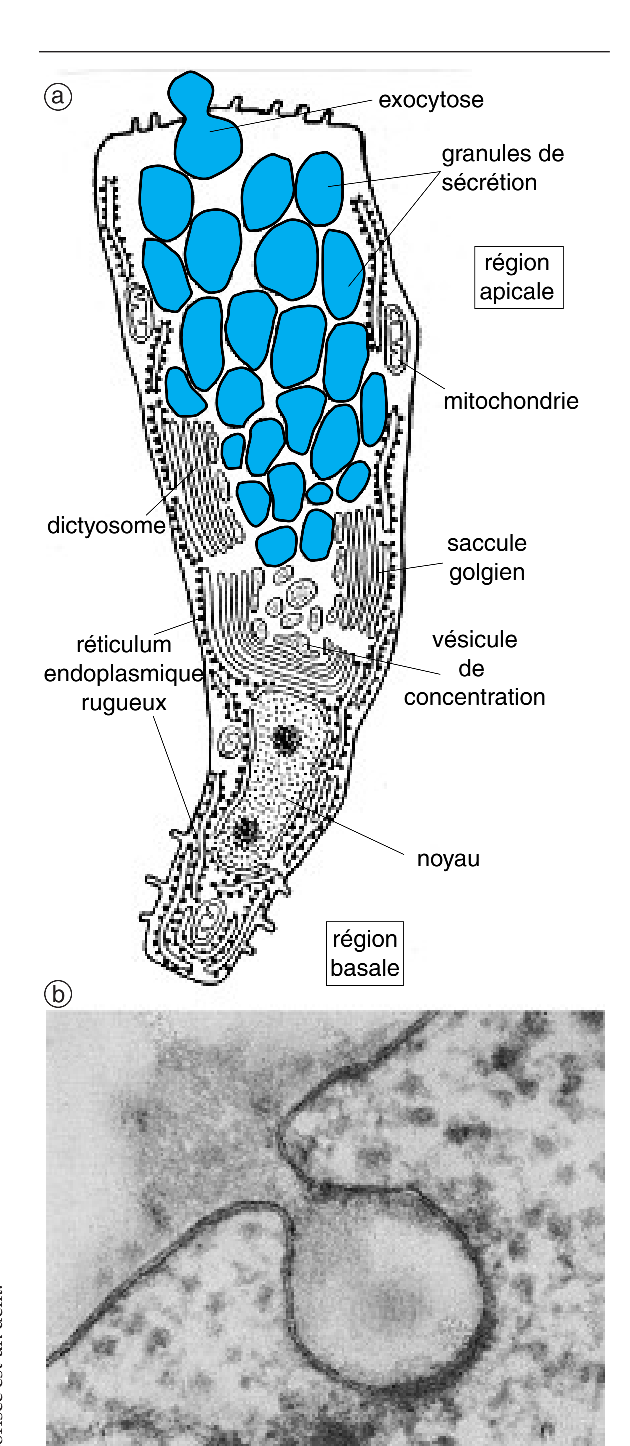


Figure 9.16

Aspect polarisé d'une cellule sécrétrice spécialisée : la cellule caliciforme à mucus

(a) Ce type de cellules allongées, très riches en grains de sécrétion, se rencontre dans l'épithélium de l'intestin grêle des Vertébrés, entre les entérocytes ; elles sécrètent d'abondantes quantités de glycoprotéines et de polysaccharides qui forment un mucus protecteur après exocytose. (D'après C. Leblond).
(b) Exocytose d'un granule de mucus.

lations, dès leur arrivée dans les premiers saccules golgiens.

3.3.1. Poursuite de la N-glycosylation

Ces phénomènes concernent les groupements oligosaccharidiques fixés au niveau de l'asparagine, et remaniés dans le RR. Deux cas sont possibles.

• Le tronc élagué dont on a parlé plus haut n'est plus modifié (au moins en ce qui concerne les sucres) et on obtient un motif simple dit « riche en mannose », caractérisant les protéines qu'on retrouvera spécifiquement dans les lysosomes.

• La déglycosylation se poursuit dans les saccules cis jusqu'à l'obtention d'un motif minimum à sept sucres (sur les quatorze de départ). Celui-ci est ensuite l'objet d'une nouvelle glycosylation, par élongation des chaînes restantes dans les saccules médium et trans, qui implique des composés différents de ceux de départ : galactose, fucose, acide sialique… Dans ce dernier cas, on parle de « motifs complexes », dont il existe une grande variété, mais qui restent toujours de petite taille : moins de 14-15 résidus sucrés (voir *figure* 9.17). Chez les Mammifères, la **thyroglobuline** (protéine sécrétée par les follicules thyroïdiens ; voir chapitre 7) est un exemple de glycoprotéine contenant des oligosaccharides de ce type qui représentent 10 % de la masse de la molécule.

Les nombreuses enzymes mises en jeu (mannosidases, transférases) sont membranaires et elles agissent séquentiellement, le long des différents saccules golgiens. Il faut se représenter le dictyosome comme une « chaîne de montage », chaque saccule étant spécialisé dans un nombre limité d'étapes de déglycosylation ou de glycosylation.

3.3.2. Réalisation de la O-glycosylation (simple et complexe)

Deux situations, très schématiquement, sont rencontrées en fonction de la taille et de la complexité des motifs glucidiques ajoutés aux protéines. Chez les Animaux, ces derniers sont accrochés aux acides aminés à fonction alcool : en général, la sérine et la thréonine (exceptionnellement l'hydroxylysine : une lysine hydroxylée post-traductionnellement) ; chez les Végétaux, un autre acide aminé peut être utilisé : l'hydroxyproline

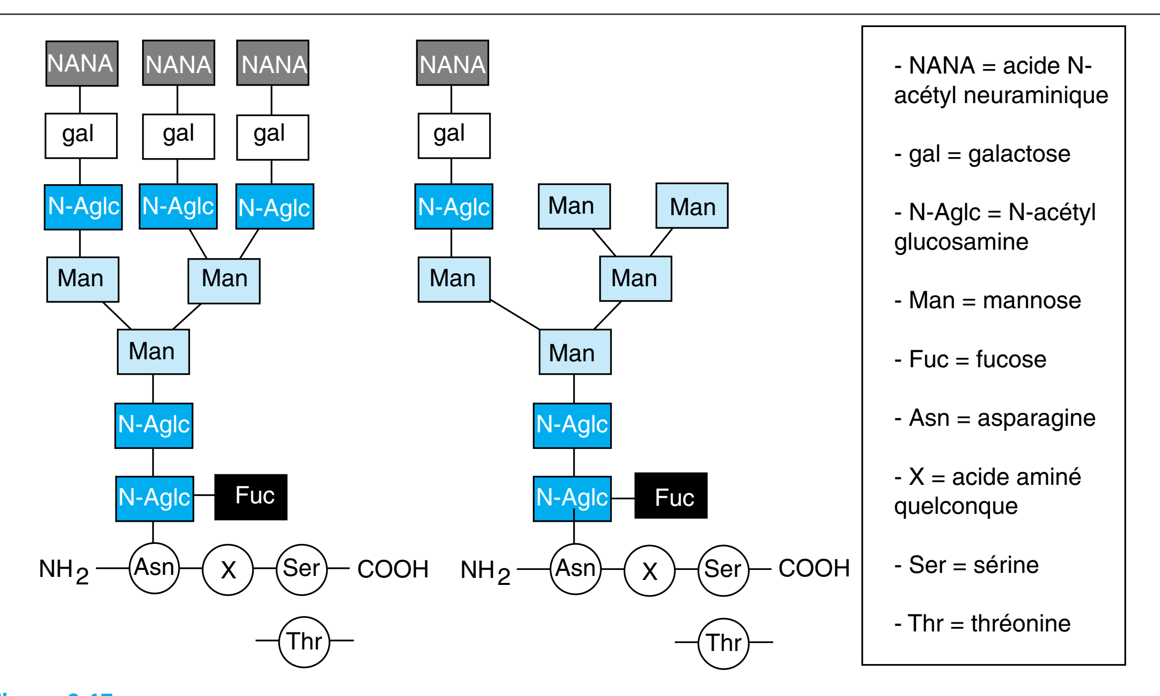


Figure 9.17

Motifs de glycosylation complexe des protéines

Ces différents motifs résultent de la modification, au sein de l'appareil de Golgi, du motif oligosaccharidique commun installé dans le réticulum endoplasmique rugueux au cours de la N-glycosylation.

(une proline elle aussi hydroxylée post-traductionnellement). Soit ces motifs sont simples et constitués de un à quatre résidus sucrés (ou dérivés de sucres), comme on en touve dans la **glycophorine**, protéine glycosylée transmembranaire très abondante dans les hématies humaines, soit ils sont de très grande taille et très complexes au plan chimique (chaînes de **glycosaminoglycanes** de 80 résidus ou plus ; voir chapitre 14).

Dans le premier cas, les molécules obtenues sont nommées **glycoprotéines** ; la partie glucidique ne représente jamais plus de 50-60 % de la masse totale de la molécule. Dans le second cas, on peut obtenir des molécules de très haute masse moléculaire, dont l'essentiel est constitué de sucres ou dérivés (jusqu'à 95 %) et dont la partie axiale, proprement protéique, devient très minoritaire en masse ; de telles molécules sont nommées **protéoglycanes**. Les dérivés sucrés de ces dernières possèdent des groupements substitués divers : acides, amines, acétyles, sulfates…, qui confèrent à ces macromolécules des propriétés de charge électrique et d'hydrophilie remarquables. Les protéoglycanes sont des composés de sécrétion que l'on retrouve dans les espaces extracellulaires, sous forme de **matrice extracellulaire** plus ou moins minéralisée : tissu conjonctif, cartilage… (en association avec des protéines ; voir chapitre 13). Les mucus divers, à rôle protecteur ou lubrifiant, produits par les organismes ou les êtres unicellulaires sont aussi des molécules de ce type.

3.3.3. Enzymologie de la O-glycosylation

La synthèse des longues chaînes de sucres modifiés, le greffage des sulfates (grâce à des sulfo-transférases), l'accrochage sur les chaînes polypeptidiques, se déroulent dans les saccules les plus externes de l'appareil de Golgi, où toutes ces réactions sont catalysées par une panoplie complexe d'enzymes membranaires ou solubles appropriées. L'accumulation de tels composés dans les saccules trans des dictyosomes est sans doute responsable de leur aspect gonflé et irrégulier.

Les sucres utilisés comme substrats sont en fait des molécules activées : les nucléotides-sucres (UDP-glucose, le GDP-mannose, l'UDP-galactose, l'UDP N-acétylglucosamine…). Ces composés sont produits dans le hyaloplasme et doivent être importés dans les saccules golgiens pour assurer la glycosylation. La membrane de ces derniers

contient en fait de nombreux transporteurs spécifiques fonctionnant comme des antiports : ils échangent un nucléotide-sucre extérieur contre le nucléotide seul correspondant, obtenu après la réaction de glycosylation (celui-ci est ainsi réexporté et recyclé). Toutes les **glycosyl-transférases**, qui accrochent les sucres les uns après les autres et allongent les chaînes, sont des protéines membranaires intrinsèques dont le site actif est tourné vers la lumière du saccule ; parmi celles-ci, la galactosyl-transférase constitue un excellent marqueur des microsomes golgiens. L'addition d'acide sialique, qui marque en général la fin des chaînes saccharidiques, a lieu dans le réseau transgolgien.

L'ordre exact des monomères est imposé par la séquence des réctions d'accrochage, elle-même déterminée par la spécificité des nombreuses transférases mises en jeu : celles-ci ne reconnaissent en effet comme substrats que certains motifs devant subir la polymérisation et certains sucres activés précis. La séquence d'élongation est ordonnée car le produit d'une réaction devient le substrat unique de la suivante, et ainsi de suite. Il faut enfin signaler que des résidus glucidiques peuvent aussi être accrochés aux lipides membranaires, les enzymes mises en jeu étant souvent les mêmes que celles signalées plus haut. On peut illustrer ceci en disant que les motifs caractéristiques des groupes sanguins A, B et O sont communs aux glycoprotéines et aux glycolipides de la surface des globules rouges chez l'Homme.

3.3.4. Diversité des rôles de la glycosylation des protéines

La diversité et l'ampleur des phénomènes de glycosylation des protéines conduisent à s'interroger sur ses fonctions biologiques. Un rôle de protection peut tout d'abord être évoqué ; les oligosaccharides courts de type N ou O ne sont pas flexibles et comme ils font saillie à la surface des protéines, ils permettent sans doute de diminuer l'accessibilité à d'autres macromolécules qui pourraient leur être «nuisibles», telles que des protéases. Ceci est sans doute vrai pour les protéines sécrétées dans la lumière ou à la surface de l'épithélium de l'intestin des Vertébrés, qui constitue un milieu très agressif (présence des sucs digestifs), et pour les protéines lysosomales (voir chapitre 7). Les glycoprotéines sont rendues très hydrosolubles par la présence des nombreux groupements polaires neutres ou chargés qu'elles portent à leur surface ; elles peuvent ainsi, comme c'est le cas pour les protéines des matrices extracellulaires, former des gels hydratés plus ou moins lâches assurant une grande diversité de fonctions (voir chapitre 14). De même, la lutte contre la déshydratation, chez certains organismes, est assurée par des mucoprotéines fortement glycosylées et retenant de grandes quantités d'eau (mucus des Amphibiens, des Mollusques terrestres…).

De manière plus subtile, nous verrons plus tard que la reconnaissance entre cellules et l'adhérence intercellulaire au sein des tissus sont conditionnées par des glycoprotéines membranaires de surface : molécules de type cadhérines, CAM… ; les jonctions intercellulaires spécialisées contiennent également des molécules de ce type (voir chapitre 14). L'intervention de motifs oligosaccharidiques dans le tri intracellulaire des protéines sera discutée plus tard avec l'exemple des protéines lysosomales. Tous les mécanismes de reconnaissance du soi, de marquage des cellules chez les organismes supérieurs (groupes sanguins, phénomènes d'histocompatibilité…), mettent aussi en jeu des glycoprotéines et des glycolipides de surface. Enfin, des données récentes suggèrent que la glycosylation soit impliquée dans la structuration même des protéines.

3.4. Clivages protéolytiques

3.4.1. Exemples et mécanismes en jeu

Outre la suppression de la séquence-signal N-terminale des protéines de sécrétion et de certaines protéines membranaires, qui a lieu dans le RR alors que la protéine est encore naissante, d'autres événements de clivage (post-traductionnels) peuvent avoir lieu dans l'appareil de Golgi. Ces clivages tardifs commencent dans les saccules trans du dictyosome et se poursuivent en général dans les vésicules de sécrétion. Les protéines suivantes sont ainsi l'objet de clivages internes : albumine, insuline, glucagon, hormone parathyroïdienne… ; ce phénomène n'est cependant pas universel et on connaît de nombreuses protéines sécrétées non modifiées au cours de leur trajet : hormone de croissance, lyzozyme, ovomucoïde…

Les précurseurs synthétisés dans le RR sont inactifs ; ils doivent absolument subir ces clivages pour acquérir leur activité. Les enzymes assurant les coupures sont des protéases membranaires,

dont le site catalytique est tourné vers la lumière du saccule golgien ; elles reconnaissent des paires d'acides aminés basiques le long de la chaîne polypeptidique à couper : Lys-Lys, Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg. Les clivages ont lieu à droite de ces séquences (du côté COOH). Dans certains cas, des exopeptidases C-terminales éliminent ces deux acides aminés qui ont servi de signal, une fois qu'ils ont rempli leur rôle. On peut illustrer ceci en décrivant le processus de fabrication de l'**insuline**, hormone pancréatique sécrétée par les cellules β des «îlots de Langerhans» (voir *figure* 9.18).

L'insuline est fabriquée dans le RR sous forme d'une **pré-pro-insuline** (108 acides aminés) ; après élimination du peptide signal, elle devient **pro-insuline** et elle passe sous cette forme dans l'appareil de Golgi, grâce aux vésicules de transition. Comme on l'a dit plus haut, elle a acquis ses structures secondaire et tertiaire : les extrémités N et C se sont rapprochées au sein d'une structure stabilisée par deux ponts disulfure (il existe deux cystéine à chaque extrémité). Au cours de son trajet dans les saccules golgiens, l'insuline est empaquetée dans les mêmes vésicules qu'une endoprotéase qui provoquera en son sein deux coupures protéolytiques grâce aux signaux vus plus haut. Le résultat est l'élimination d'une longue boucle d'acides aminés (peptide C) et l'obtention de la forme mature de l'hormone, constituée par deux courtes chaînes parallèles réunies par des ponts disulfure (peptides A et B : 21 et 30 acides aminés). Cette forme définitive n'est obtenue que dans les vésicules bourgeonnant du réseau trans de l'appareil de Golgi, qui subissent rapidement l'exocytose.

Le cas du **glucagon** (une autre hormone pancréatique) est voisin mais il y a besoin ici de trois clivages successifs par une endoprotéase et de l'action d'une carboxypeptidase pour éliminer les acides aminés basiques fonctionnant comme signal.

Figure 9.18

Clivages protéolytiques conduisant à la production de l'insuline

Après avoir acquis sa structure tertiaire, cette hormone est découpée en trois fragments, dont un sera éliminé (c). Ces événements de clivage très spécifiques se déroulent dans l'appareil de Golgi et dans les vésicules de sécrétion.

3.4.2. Polyprotéines

Cette stratégie de clivage est poussée à l'extrême dans le cas des **polyprotéines**, qui contiennent de multiples copies d'une même courte séquence peptidique : un seul précurseur permet d'obtenir plusieurs produits identiques ou voisins à partir du même gène (neuropeptides de type enképhalines, hormones de l'antéhypoplyse : ACTH, endorphines...). Ce système a été développé essentiellement par des cellules sécrétrices de toxines, d'hormones ou d'enzymes, et a sans doute pour effet de retarder jusqu'au dernier moment (celui de la sécrétion) la production de la forme fonctionnelle des protéines, qui auraient pu être nuisibles ou toxiques pour la cellule. C'est enfin une façon de fabriquer des peptides actifs très courts (cinq acides aminés) qui ne pourraient probablement pas être synthétisés sur des ribosomes selon le processus habituel de la traduction.

3.5. Synthèse de glycoprotéines et de polysaccharides pariétaux chez les Végétaux et les Champignons

Outre des composés de nature polysaccharidique, la paroi des Végétaux supérieurs contient une faible proportion de glycoprotéines (0,1 à 10 % de la masse sèche). Ces molécules sécrétées, qui

sont fabriquées dans le RR selon le mécanisme d'insertion classique, modifiées à travers l'appareil de Golgi et exportées grâce à des vésicules, sont caractérisées par une grande richesse en un acide aminé particulier : l'hydroxyproline. Ce dernier sert de substrat à l'accrochage, par O-glycosylation, de courtes chaînes oligosaccharidiques d'arabinose (une à quatre unités). De plus, certaines molécules de sérine du polypeptide sont greffées avec du galactose. Ces glycoprotéines sont nommées **HRGP** (*hydroxyprolin rich glycoproteins*, en anglais), ou bien parfois **extensines**, car on pense qu'elles confèrent une certaine élasticité à la paroi.

Chez les Végétaux, l'appareil de Golgi participe surtout à la synthèse et à la sécrétion de constituants polysaccharidiques de la matrice pariétale, représentés essentiellement par les pectines et les hémicelluloses. On rappelle que la cellulose, composant fibrillaire majeur de la paroi, fait l'objet d'un mode de synthèse totalement différent, au niveau de structures spécialisées localisées à la surface de la membrane plasmique. Les deux types de polysaccharides sécrétés sont des molécules très complexes formées d'un axe (d'acide galacturonique et de rhamnose, pour les premières, et de glucose ou de xylose, pour les secondes), portant des branches latérales, monotones ou pas, contenant divers sucres : galactose, arabinose, xylose, fucose… (voir chapitre 13).

La polymérisation de ces composés a lieu dans la lumière des saccules golgiens, grâce à des enzymes membranaires (glycosyl-transférases) dont les sites actifs sont tournés vers l'intérieur. De même que chez les cellules animales, ces enzymes utilisent comme substrats des sucres activés synthétisés dans le hyaloplasme, afin d'allonger les chaînes polysaccharidiques par leur extrémité, et de greffer les branches latérales. La séquence spécifique des sucres est également déterminée par la spécificité des nombreuses transférases mises en jeu, celles-ci ne reconnaissant comme substrats que certains motifs devant subir la polymérisation et certains sucres activés précis. Le transfert des précurseurs à travers les membranes golgiennes et leur concentration dans les saccules sont assurés par une multitude de transporteurs spécialisés. Les techniques histochimiques (test APS appliqué à la microscopie électronique) montrent que les grosses vésicules émises par l'appareil de Golgi sont remplies de ces polysaccharides et qu'elles fusionnent avec la membrane plasmique ; l'exocytose est ici aussi l'étape finale de ce processus.

La paroi des Champignons a une composition différente de celle des Végétaux, et elle est en particulier plus riche en protéines. Les principes de son élaboration sont cependant identiques à ce qui vient d'être décrit, en ce qui concerne la sécrétion des polysaccharides et des polypeptides pariétaux.

4. RÔLE DE L'APPAREIL DE GOLGI DANS LE TRI DES PROTÉINES DE LA VOIE DE SÉCRÉTION

Nous avons annoncé plus haut que trois voies majeures partent de l'appareil de Golgi, en ce qui concerne les protéines qui y transitent. Dans le détail, on distingue cependant cinq destinations différentes pour ces molécules : deux cas de figure peuvent se présenter pour les protéines de la membrane plasmique ; de même, pour l'exocytose, les sécrétions continue et intermittente ont été différenciées ; enfin, les lysosomes constituent une dernière possibilité d'aiguillage. Le tri des protéines et leur distribution dans différents types de vésicules sont réalisés au niveau du réticulum transgolgien ; cette observation conduit à se poser les questions suivantes :

– comment des protéines particulières y sont-elles concentrées dans un type unique de vésicules ?
– comment ces vésicules sont-elles envoyées vers des cibles précises ?
– comment se font le tri et la séparation, pour les protéines membranaires et solubles, entre les deux voies de sécrétion ?

4.1. Répartition des protéines membranaires dans divers domaines de surface chez les cellules polarisées

Les cellules épithéliales, en particulier celles à vocation sécrétrice, sont caractérisées par l'existence d'une forte polarité morphologique et fonctionnelle. Au niveau de leur membrane plasmique, ceci se traduit par une différenciation en deux domaines :

– le **domaine apical**, qui porte les microvillosités, des transporteurs et des enzymes spécifiques

chez les entérocytes, ou bien au niveau duquel fusionnent les vésicules d'exocytose, chez les cellules pancréatiques ou caliciformes ;

– le **domaine basolatéral**, qui couvre les côtés de la cellule et sa partie basale.

Dans les **entérocytes**, la membrane plasmique porte des transporteurs qui lui sont propres, ainsi que de nombreux systèmes d'ancrage (jonctions) ou de communication intercellulaire (voir *figure* 9.19 et chapitres 6, 11 et 13). Ces deux domaines fonc-

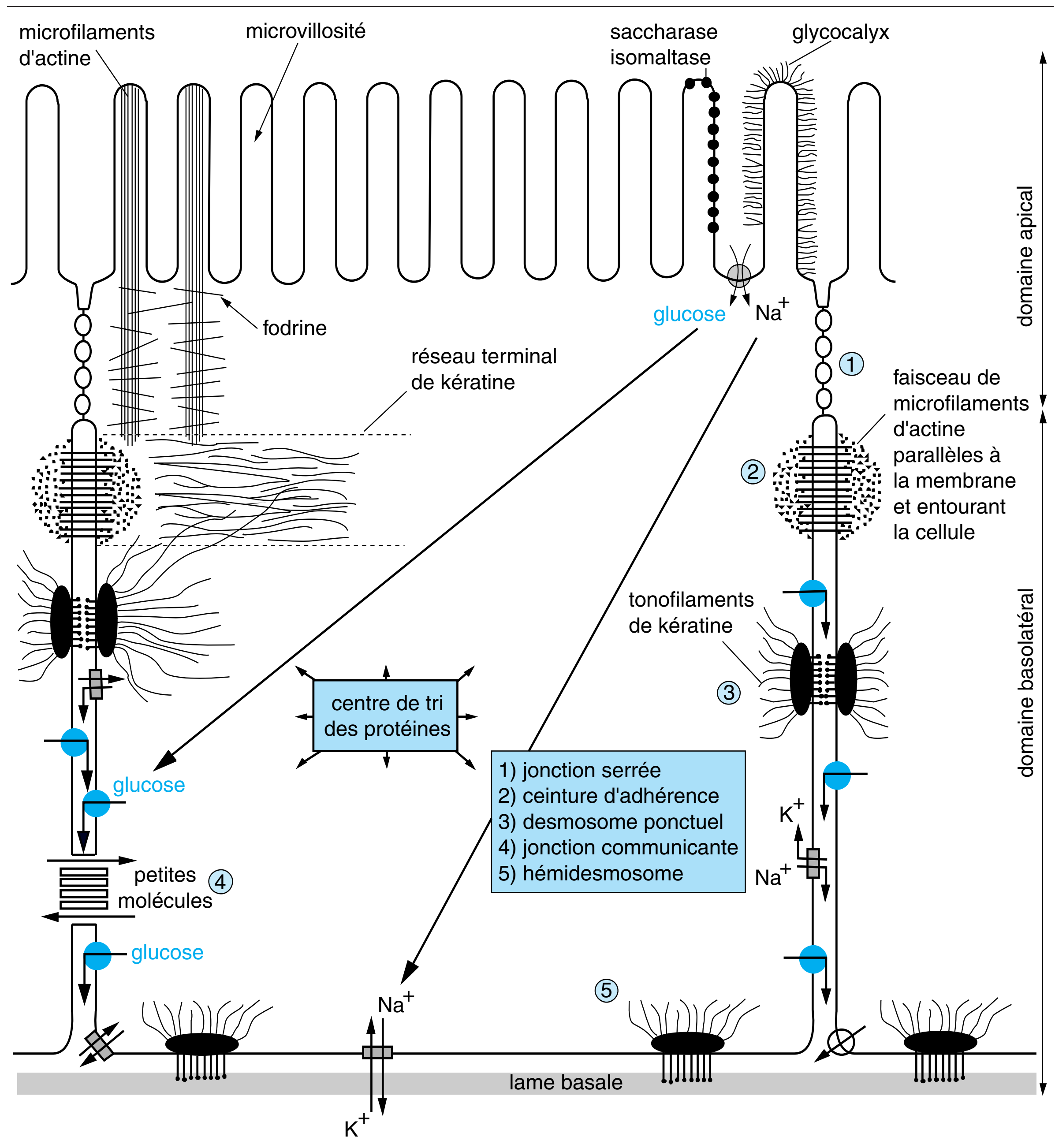


Figure 9.19

Schéma d'une cellule polarisée : l'entérocyte de Vertébré (voir aussi les *figures* 6.14 et 11.14)

À travers ses diverses différenciations : cytosquelette, jonctions intercellulaires, transporteurs, enzymes et structures membranaires, cette cellule illustre bien les rapports existant entre polarité structurale et polarité fonctionnelle. Elle montre aussi la nécessité d'un centre de tri au sein de la cellule, dont le rôle est d'adresser toutes les protéines constitutives de ces structures vers leurs destinations finales. La fodrine est une protéine de la famille des spectrines.

tionnellement distincts sont séparés par un type de jonction particulier qui soude les membranes de deux cellules voisines et empêche ainsi toute diffusion latérale (par fluidité membranaire) des constituants qui leur sont spécifiques. La question qui est posée ici est donc de savoir comment les protéines membranaires intrinsèques et celles, solubles, qui leur sont associées (extrinsèques), sont triées et aiguillées vers ces deux domaines. Pour les premières, qui transitent par l'appareil de Golgi et atteignent la membrane par exocytose, on doit imaginer un système d'étiquetage moléculaire semblable à celui que l'on étudiera plus loin pour les lysosomes ou les protéines sécrétées.

Il existe un modèle expérimental qui apportera sans doute des réponses à ces questions : il s'agit des Virus enveloppés parasitant des cellules animales, qui bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique pour sortir des cellules-hôtes infectées. Grâce à des cellules épithéliales cultivées *in vitro*, qui gardent leur caractère polarisé en culture, on a montré que différents Virus ont des « voies de sortie » distinctes : par exemple, le virus de la grippe bourgeonne sur la face apicale des cellules, tandis que le Virus de singe nommé VSV bourgeonne au niveau basolatéral. Il est connu que le bourgeonnement est lié à la présence de protéines virales qui sont spécifiquement adressées à ces deux domaines membranaires. Des expériences de génie génétique utilisant des protéines modifiées, dites chimères, associées à une approche immunocytochimique (permettant de suivre le mouvement des protéines au sein de la cellule) montrent qu'une étiquette d'origine golgienne existe et qu'elle est portée par le domaine intraluminal (face extracellulaire) des protéines membranaires concernées. La nature du signal et le mécanisme de tri dans le réseau transgolgien n'ont pas été entièrement élucidés.

4.2. Séparation des voies de sécrétion constitutive et contrôlée

Les vésicules destinées à la voie contrôlée ont une propriété originale : elles sont initialement recouvertes de clathrine (qui est perdue dès que la vésicule est close) ; la concentration en leur sein d'un nombre limité et bien précis de protéines implique un mécanisme de tri destiné à les séparer de celles utilisant la voie constitutive. On a montré qu'il existe, dans le réseau transgolgien, des protéines membranaires de type récepteur qui ne reconnaissent et ne fixent (du côté de la lumière) que les protéines appartenant à la voie contrôlée. Toutes ces protéines sécrétées doivent donc porter, sans doute à leur surface, un **signal de tri** commun permettant de les rassembler et de les concentrer au sein de vésicules ; la formation d'agrégats, liée à la proximité des récepteurs au sein de la membrane, pourrait favoriser le bourgeonnement de ces dernières. Ce mécanisme rappelle ce qui a déjà été décrit pour la capture et la concentration de protéines extracellulaires fixées par les récepteurs de la membrane plasmique (voir chapitre 7). Un point commun entre ces deux processus est la mise en œuvre pour l'internalisation, dans un cas, et le bourgeonnement dans l'autre, de molécules de clathrine.

Pour ce qui concerne la voie constitutive, on considère actuellement qu'elle ne nécessite pas de signal de tri particulier des protéines, à la différence de la précédente et de celle mise en œuvre pour les protéines lysosomales (voir plus loin). Ce type de signalisation négative est dit « par défaut » ; les vésicules mises en jeu sont initialement recouvertes d'un feutrage ne contenant pas de clathrine. Un schéma général résumant ce qui est connu à l'heure actuelle en ce qui concerne le tri des protéines dans l'appareil de Golgi est donné dans la *figure* 9.20.

4.3. Principe de l'adressage des protéines vers le compartiment lysosomal

Les phénomènes d'aiguillage de protéines vers des vésicules spécifiques et de reconnaissance entre compartiments sont donc en général mal connus ; le seul exemple d'étiquetage et d'adressage de protéines qui soit actuellement décrit en détail au niveau moléculaire est celui des lysosomes. Ces derniers ont été présentés au plan structural et fonctionnel dans le chapitre 7.

4.3.1. Rappels et problématique

On rappelle que ces organites constituent un ensemble très polymorphe de vésicules unimembranaires d'origine golgienne, contenant une importante collection d'enzymes hydrolytiques. Comment de telles vésicules, bourrées d'hydrolases, se forment-elles et « savent-elles » qu'elles doivent aller uniquement fusionner avec un endosome (et non avec n'importe quel organite), ou

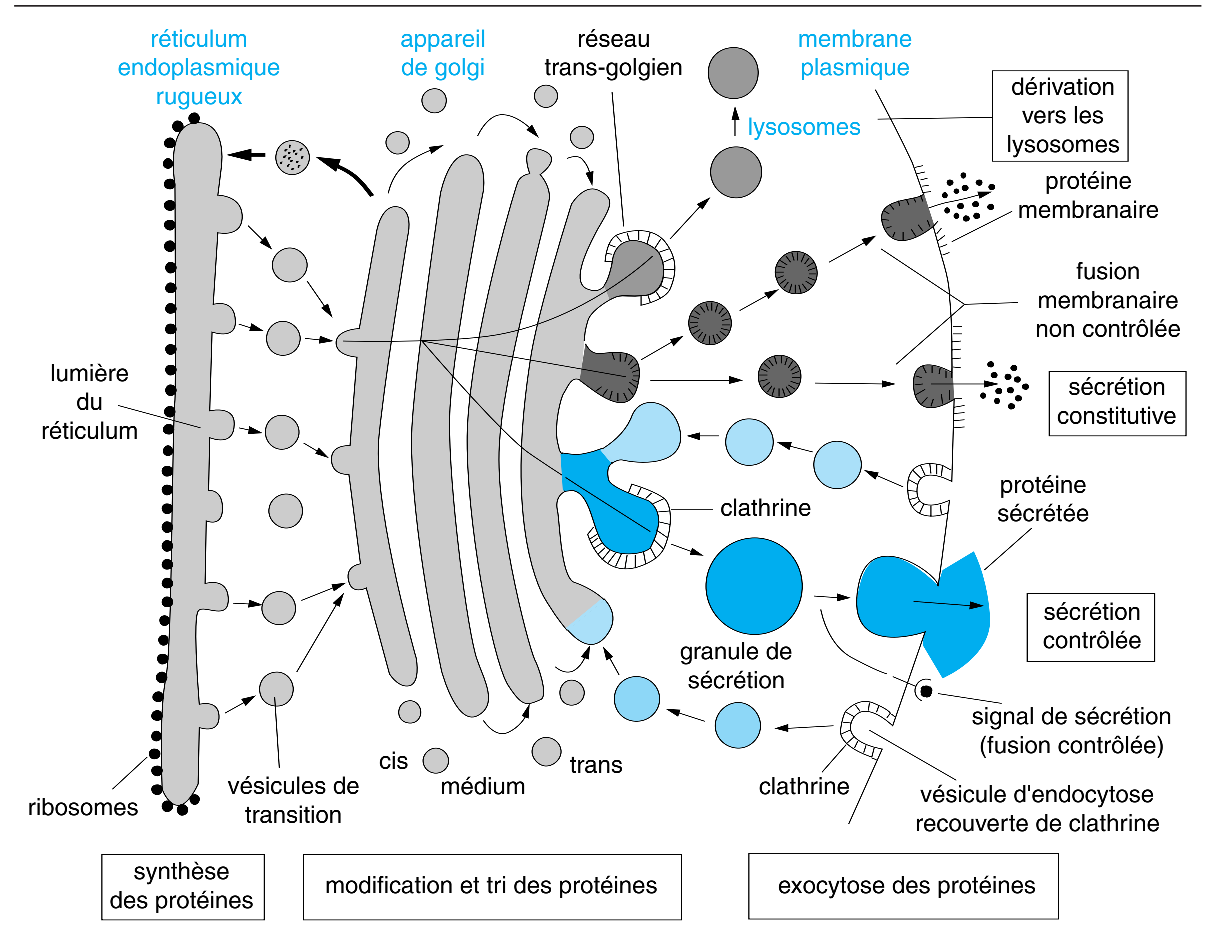


Figure 9.20

Diverses voies suivies par les protéines à travers l'appareil de Golgi

Trois voies sont identifiées, qui conduisent les protéines vers les lysosomes, la membrane plasmique ou le milieu extracellulaire. Deux modes de sécrétion doivent être distingués : le mode contrôlé, qui concerne les cellules sécrétrices spécialisées, et le mode constitutif, qui concerne toutes les cellules. Le transport rétrograde des protéines du réticulum (protéines résidentes et récepteurs associés) est mentionné.
Noter la présence ou non de clathrine sur certaines des vésicules impliquées dans ces processus.

bien éclater à la surface de la cellule ? Ce système est bien connu pour ce qui concerne les mécanismes de concentration de protéines données au sein d'une même vésicule. Les enzymes lysosomales sont en effet très faciles à caractériser, à mettre en évidence cytologiquement (cytoenzymologie, immunocytochimie) et à purifier. On montre qu'elles sont toutes munies, au départ, d'une séquence-signal d'adressage normale vers le RR, comme celle décrite pour toutes les protéines sécrétées. La question est de savoir comment cette collection unique de protéines particulières est ensuite triée dans l'appareil de Golgi parmi les centaines qui y pénètrent à tout instant.

4.3.2. Mécanismes moléculaires de l'adressage vers les lysosomes

Deux éléments d'explication ont été mis en évidence.

• Toutes les hydrolases lysosomales possèdent des résidus N-glycosylés portant des mannose 6-phosphate. On a déjà signalé que la N-glycosylation commençait dans le RR et que même une déglycosylation partielle avait lieu dans ce compartiment. À la sortie du réticulum, toutes les protéines possèdent donc des motifs riches en mannose mais seules celles destinées aux lysosomes seront phosphorylées au niveau de ces

sucres, dans les saccules cis des dictyosomes ; le mécanisme de reconnaissance de ces dernières sera décrit plus loin. Cette phosphorylation empêche en fait toute évolution ultérieure de la glycosylation car les diverses glycosidases golgiennes agissant ultérieurement sont inefficaces sur des motifs glucidiques déjà phosphorylés. On a là une première discrimination entre deux familles de protéines au sein des saccules cis des dictyosomes : on peut donc parler d'un **étiquetage moléculaire**.

• Il existe dans les membranes du réseau transgolgien des protéines intrinsèques qui fonctionnent comme des récepteurs au mannose 6-P. Ces molécules, dont le site de reconnaissance est tourné vers la lumière des saccules, sont capables de reconnaître et de fixer spécifiquement les protéines possédant ce marqueur moléculaire, c'est-à-dire les enzymes lysosomales. Selon un mécanisme encore peu clair, ces récepteurs s'accumulent au sein de petites vésicules recouvertes de clathrine qui bourgeonnent au niveau du réseau transgolgien. Après avoir perdu leur revêtement, ces vésicules deviennent des **lysosomes primaires** (voir chapitre 7).

On comprend bien comment les récepteurs au mannose 6-P, qui sont rassemblés au niveau d'un type particulier de vésicules, trient et concentrent les protéines possédant le marqueur en question, mais ceci n'explique pas clairement comment d'autres protéines sont exclues de ces vésicules. Le récepteur au mannose 6-P est bien caractérisé : il fixe l'oligosaccharide à pH 7 (pH du contenu des saccules golgiens) et le relâche à pH 6. De cette façon, les récepteurs sont libérés dès que les lysosomes primaires entrent en contact avec les vésicules endosomales, dont le pH est suffisamment acide (voisin de 5). Ces récepteurs sont ensuite à nouveau concentrés dans des vésicules spécialisées et réexpédiés vers le réseau transgolgien où ils pourront resservir : c'est l'étape de recyclage. Les phosphatases acides des lysosomes déphosphorylent enfin les résidus mannose qui ont permis aux autres enzymes de s'accumuler dans la cavité (voir *figure* 9.21).

Dans ce système, l'étape clef est donc constituée par le marquage initial des mannoses grâce au phosphate ; parmi toutes les protéines qui entrent dans le premier sac golgien, comment se fait la reconnaissance de celles destinées aux seuls lysosomes ? On a montré qu'une enzyme responsable de ce processus reconnaît un domaine de surface commun à toutes ces molécules, qui agit comme un signal. Cette enzyme aurait donc deux sites spécifiques : 1) un site de reconnaissance de la protéine elle-même, dont le fonctionnement est capi-

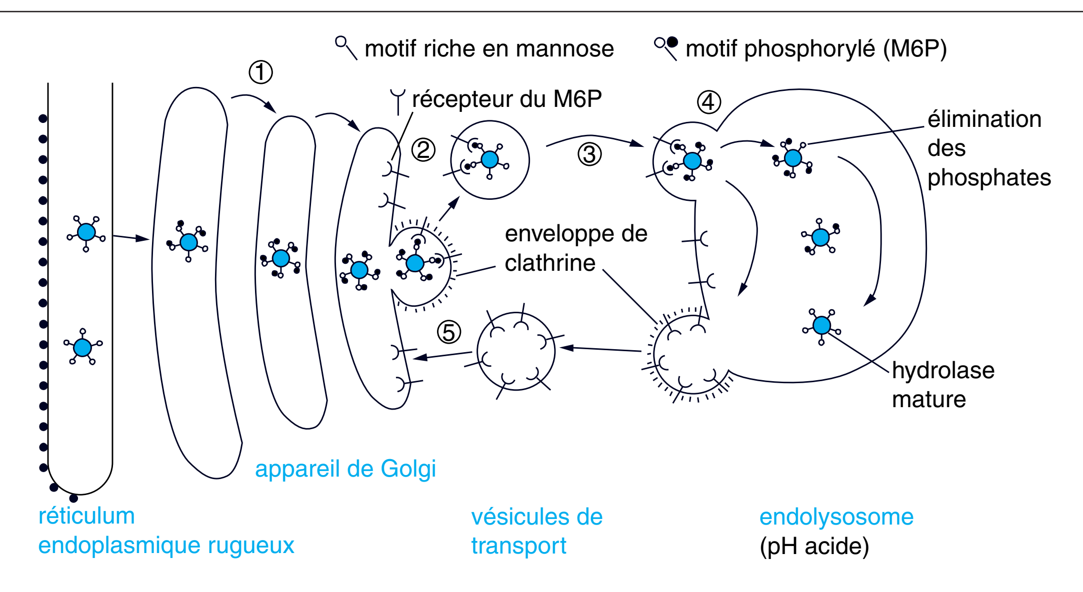


Figure 9.21

Étiquetage des hydrolases dans l'appareil de Golgi et adressage vers les lysosomes

Les étapes principales sont : **(1)** le marquage du mannose avec un groupement phosphate ; **(2)** la liaison de la protéine au récepteur du mannose 6-P ; **(3)** le transport vers un endosome ; **(4)** la dissociation de la protéine de son récepteur ; **(5)** le recyclage des récepteurs libérés vers les saccules transgolgiens.

tal, et 2) un site catalytique banal participant à la fixation d'un groupement donneur de phosphate sur les résidus mannose.

4.3.3. Adressage vers la vacuole des Plantes et des Champignons

Les vacuoles ressemblent aux lysosomes en ce sens qu'elles renferment de nombreuses glycoprotéines de type hydrolases ; les précurseurs de ces dernières sont fabriqués dans le RR, puis ils transitent à travers l'appareil de Golgi et sont adressés aux vacuoles. Contrairement aux cellules animales, le mécanisme utilisé ne met pas en œuvre les motifs N-glycosylés riches en mannose et phosphorylés, car la tunicamycine (un inhibiteur de cette glycosylation) ne modifie pas l'adressage vers la vacuole, du moins chez la levure. En revanche, chez cet organisme, il est acquis qu'une séquence-signal commune de grande taille (50 à 100 acides aminés) est reconnue, en raison de sa conformation, et intervient dans ce processus. Cette longue séquence est finalement clivée dans la vacuole. Au moins trente gènes concernant la sécrétion et le ciblage des protéines ont été identifiés chez la levure ; ce matériel biologique est donc très intéressant car l'isolement de ces gènes y est relativement aisé, ce qui permettra, par une approche moléculaire transversale basée sur une homologie probable entre les gènes, de rechercher ces derniers chez les organismes supérieurs.

De façon générale, chez les Végétaux, l'adressage vers le milieu extérieur (par exocytose) se ferait en revanche par défaut de signal, comme dans le cas de la voie constitutive chez les Animaux.

5. ROUTAGE DES PROTÉINES VERS LE NOYAU, LES ORGANITES SEMI-AUTONOMES ET LES PEROXYSOMES

5.1. Principe du routage post-traductionnel

Contrairement à ce qu'on vient de voir au sujet des protéines fabriquées au niveau du réticulum rugueux, celles destinées à constituer tous les autres compartiments cellulaires sont synthétisées dans leur totalité au sein du hyaloplasme, sur les cytoribosomes libres. C'est seulement dans un deuxième temps que ces protéines achevées seront dirigées vers leur cible définitive ; on parle alors de **routage post-traductionnel**. Les quatre destinations majeures concernées sont : le hyaloplasme lui-même, le noyau, les organites semi-autonomes (mitochondries et plastes) et les peroxysomes ; on connaît néanmoins quelques rares cas particuliers d'adressage post-traductionnel vers le RR.

Dans leur principe, les mécanismes mis en œuvre lors de ce routage rappellent ce qui a été décrit au sujet de l'insertion cotraductionnelle. L'importation d'une chaîne polypeptidique dans un organite donné nécessite ici aussi l'intervention du couple : séquence-signal/récepteur membranaire, la première étant portée par la chaîne, le second étant porté par la membrane la plus externe limitant l'organite ; elle nécessite de même la présence de systèmes protéiques faisant office de tunnel transmembranaire. Une condition supplémentaire doit cependant être remplie, au plan énergétique : l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au fonctionnement de protéines particulières (dites **chaperons**), présentes dans le hyaloplasme, dont le rôle est de dérouler la chaîne polypeptidique afin de permettre son transfert à travers la membrane ; ce point fera l'objet d'un développement séparé. Ce type de routage est plus simple et surtout beaucoup plus rapide que celui décrit plus haut, de sorte que quelques minutes seulement suffisent pour qu'une protéine passe de son ribosome hyaloplasmique à son compartiment final après avoir franchi, dans certains cas, jusqu'à trois membranes.

Une majorité de protéines reste en fait dans le hyaloplasme, où elles sont amenées à fonctionner : les enzymes solubles du métabolisme énergétique et du métabolisme intermédiaire (glycolyse, voie des hexoses-monophosphates, synthèse des acides aminés et des acides gras…), les protéines constitutives du cytosquelette et leurs protéines associées, les protéines membranaires extrinsèques dont la disposition est telle qu'elles sont tournées vers le hyaloplasme. Le cas de toutes ces protéines est particulier car on n'a pas pu montrer, à leur sujet, de mécanisme spécifique de rétention dans ce compartiment. Elles restent au sein du hyaloplasme simplement parce qu'elles ne possèdent aucun signal de routage, contrairement à celles qui se dirigeront «activement» vers les trois autres

destinations. Nous analyserons en détail les mécanismes mis en œuvre pour aiguiller des protéines vers le noyau, les mitochondries et les plastes ; le routage vers les peroxysomes étant basé sur des mécanismes très voisins de ceux présentés pour ces derniers ne sera pas traité ici.

5.2. Routage des protéines vers le noyau

Le compartiment nucléaire fait l'objet d'échanges nombreux avec le hyaloplasme :

– importation de protéines intervenant dans les activités nucléaires : réplication et transcription ; il s'agit des polymérases variées (ARN et ADN polymérases), des histones et autres protéines structurant la chromatine, des protéines de maturation des transcrits, des protéines de régulation de l'expression des gènes… ;
– exportation de particules ribonucléoprotéiques intervenant dans l'expression du matériel génétique : ARN messagers complexés à des protéines, ARN de transfert, sous-unités ribosomiques…

Seul le volet «importation» sera examiné dans ce chapitre ; comme pour tous les autres organites, celle-ci doit être très spécifique et exclure des milliers d'espèces moléculaires qui sont synthétisées et restent localisées dans le hyaloplasme.

5.2.1. Mise en évidence expérimentale de transports spécifiques vers le noyau

Le matériel biologique initialement utilisé pour ce genre d'études a été l'ovocyte d'Amphibien ; il est possible de micro-injecter de façon contrôlée, dans cette cellule géante, des composés soit dans le hyaloplasme, soit directement dans le noyau. On connaît dans l'ovocyte une grosse protéine à localisation exclusivement nucléaire, la **nucléoplasmine** (175 kDa), qui doit faire l'objet d'un adressage spécifique. Lorsque celle-ci, après avoir été purifiée et radiomarquée, est injectée dans le hyaloplasme, on constate, par autoradiographie, qu'elle disparaît totalement de ce compartiment et se concentre dans le noyau en moins de 20 minutes ; (voir *figure* 9.22). Ces expériences démontrent aussi que le lieu de passage vers le nucléoplasme est, comme on pouvait le supposer, constitué par les **complexes des pores nucléaires**. L'injection de nucléoplasmine dans le noyau n'est jamais suivie d'un retour, même mineur, de celle-ci vers le hyaloplasme. Ces données suggèrent que la simple diffusion n'est pas en jeu dans le mouvement de cette protéine ; le diamètre apparent des pores semble par ailleurs très inférieur à la taille de la protéine. Lorsqu'une protéine de masse équivalente, mais à localisation hyaloplasmique, est injectée dans les mêmes conditions, elle n'est jamais importée par le noyau.

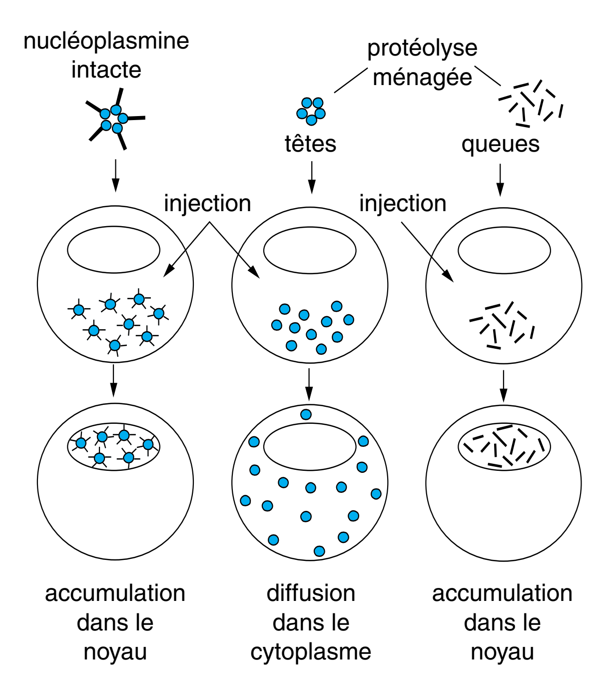


Figure 9.22
Expériences d'injection de la nucléoplasmine marquée dans les ovocytes d'Amphibiens

Cette grosse protéine est une molécule pentamérique dont on peut séparer les têtes globulaires des queues, par protéolyse ménagée. Le signal d'importation est porté par les queues des monomères. (D'après B. Alberts et *al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*.

5.2.2. Mécanismes mis en œuvre : séquences-signal spécifiques et récepteurs

D'autres expériences de ce type montrent que seuls des composés de masse moléculaire inférieure à 60-70 kDa : métabolites, petites protéines, etc., peuvent entrer dans le noyau et en sortir librement par diffusion (voir chapitre 8). Ce mécanisme simple ne peut s'appliquer, en raison de leur taille, à la majorité des protéines nucléaires

qui, de plus, font l'objet d'une concentration que la diffusion ne peut expliquer. Le découpage de la nucléoplasmine en différents morceaux, par protéolyse limitée, et leur injection séparée, a permis d'identifier un domaine précis de la protéine impliqué dans l'adressage spécifique de cette molécule vers le noyau.

Des expériences voisines ayant été conduites avec diverses protéines nucléaires (y compris des protéines intervenant dans le cycle de certains Virus), il a été possible de dégager les caractéristiques communes à tous ces peptides ayant un rôle d'adressage. Ce sont en général de courtes séquences de cinq à dix acides aminés dans lesquelles une proline est suivie de quatre acides aminés basiques : Lys. ou Arg. ; ces séquences ont une position quelconque le long de la chaîne polypeptidique. Bien qu'apparemment très simples, ces signaux sont suffisants, ainsi que des expériences de biochimie ou de génie génétique l'ont montré : toute protéine non nucléaire à laquelle on a artificiellement «greffé» un tel peptide (soit comme chaîne latérale, soit au sein même de la chaîne polypeptidique) se dirige spontanément *in vivo* vers le noyau.

Les séquences-signal ne constituent qu'un des éléments du mécanisme d'adressage. Comme dans tout système de ce type elles doivent, pour fonctionner, être reconnues par des récepteurs ; l'immunocytochimie démontre qu'une partie d'entre eux est localisée au niveau des pores nucléaires, mais d'autres pourraient également se rencontrer dans le hyaloplasme. Ces récepteurs sont aptes à capter les protéines à importer, mais ils ne provoquent pas spontanément le passage à travers l'enveloppe. Il existe maintenant des modèles expérimentaux d'analyse *in vitro* de ce transfert, qui permettent de décortiquer complètement ses mécanismes intimes. Constitués de noyaux purifiés, de protéines importables hautement radiomarquées, et d'extraits cytoplasmiques plus ou moins fractionnés, ces modèles confirment le caractère actif du transport : une source d'énergie, sous forme d'ATP est indispensable à la pénétration. En ce qui concerne le rôle de ce dernier, deux hypothèses sont formulées : soit il participe à la déformation et à l'ouverture d'une sorte de diaphragme situé dans le pore, soit il contribue à dérouler la chaîne polypeptidique à importer au moyen de protéines spécialisées de nature encore inconnue.

5.3. Routage des protéines vers les mitochondries et les plastes. Biogenèse de ces organites

Les mitochondries et les plastes constituent un compartiment original dans la cellule en ce sens qu'ils sont les seuls organites à posséder leur propre information génétique et leur propre machinerie de synthèse protéique (voir chapitre 4). De plus, ils n'échangent visiblement pas de membrane avec les autres structures membranaires de la cellule et ne se «nourrissent» donc pas par voie de vésicules comme les structures précédemment étudiées. La majorité des protéines qui les constituent sont codées par des gènes nucléaires, fabriquées dans le hyaloplasme de la cellule et enfin importées dans l'organite. Ces protéines exogènes ajoutées à celles, rares, fabriquées sur place grâce au matériel génétique local (voir chapitre 10), contribuent à la croissance des mitochondries et des plastes qui sont finalement amenés à se diviser. De toute manière, leur nombre doit être multiplié par deux au cours du cycle cellulaire pour qu'après la division, chaque cellule-fille hérite d'un nombre à peu près égal d'organites. Si ce processus n'était pas correctement régulé, il est clair qu'à terme on obtiendrait, par simple dilution, des cellules ne possédant plus ces organites dont la présence est indispensable au fonctionnement cellulaire.

Non seulement se pose le problème du transport et de l'aiguillage des protéines d'origine hyaloplasmique vers chaque membrane ou espace intermembranaire spécifique des mitochondries et des plastes, mais aussi celui de leur assemblage : les choses sont en effet compliquées par le fait que ces protéines participent à des complexes mixtes, parfois membranaires et de grande taille, combinant à la fois des polypeptides importés et d'autres d'origine endogène (voir chapitre 10).

5.3.1. Mise en évidence expérimentale de l'importation

Ce phénomène est démontré par des expériences conduites sur des systèmes reconstitués *in vitro* comprenant : des mitochondries ou des chloroplastes purifiés, des protéines typiques de mitochondries ou de plastes intensément radiomarquées, des extraits hyaloplasmiques et une source d'énergie (ATP). Après mise en contact des partenaires, la cosédimentation de la radioactivité avec les

organites et sa résistance à un traitement protéolytique appliqué à ces derniers sont la preuve que la protéine marquée est bien entrée dedans. Les premières expériences ont montré que les protéines que l'on purifie directement à partir des organites ne sont pas capables d'être importées ; une découverte importante, due à la biologie moléculaire (vers 1980), est que seules le sont des protéines directement fabriquées *in vitro* à partir de leurs ARN messagers. Le phénomène d'importation est alors très rapide et demande moins de 3 minutes après la mise en contact avec les mitochondries.

La différence entre protéines néoformées et protéines installées dans l'organite porte sur une séquence de quelques dizaines d'acides aminés, en position N-terminale ; il est clair qu'on doit chercher à ce niveau le signal d'adressage vers l'organite. Toutes ces études ont bénéficié des résultats expérimentaux et des apports conceptuels relatifs à l'adressage vers le réticulum endoplasmique rugueux, de quelques années antérieurs.

5.3.2. Étapes et mécanismes de l'importation dans la matrice mitochondriale ou dans le stroma des chloroplastes

La comparaison de nombreuses séquences-signal d'importation de ce type, aussi bien chez les mitochondries que chez les plastes, a permis d'identifier leurs propriétés communes capitales pour l'importation, et de mieux comprendre les mécanismes en jeu. Ces séquences forment une hélice α présentant, d'un côté une large zone hydrophobe, et de l'autre une zone chargée positivement. Les protéines qui les portent sont, dès leur « sortie » du ribosome, prises en charge par d'autres protéines hyaloplasmiques spécialisées, chargées de les maintenir dans un état déroulé (**protéines-chaperons**, dont le fonctionnement nécessite l'hydrolyse de l'ATP ; voir plus loin). Grâce à la séquence-signal, ces complexes sont reconnus et fixés par des récepteurs protéiques portés par la membrane externe des organites semi-autonomes. Ainsi chargés, les récepteurs rejoignent des zones très localisées de l'enveloppe où les deux membranes se touchent : les **sites de contact** (on en compte plusieurs centaines par mitochondrie) ; à leur niveau existent des sortes de « tunnels » capables de prendre en charge à leur tour la protéine à transporter. Ces tunnels sont constitués de deux parties indépendantes, formées à la fois de protéines de la membrane externe et de la membrane interne, susceptibles de s'associer momentanément. Le récepteur et les protéines-chaperons sont ensuite recyclés dans le noyau (voir *figure* 9.23).

La séquence-signal N-terminale est la première à franchir ce tunnel et elle se trouve directement injectée dans la matrice ou dans le stroma. La force qui tire cette séquence vers l'intérieur est identifiée, au moins chez les mitochondries, au puissant champ électrique qui existe de part et d'autre de la membrane interne ; la suppression de ce dernier, par différentes méthodes qui détruisent le gradient de protons (voir chapitre 10), inhibe la pénétration. On calcule que le champ électrique associé à ce gradient est supérieur à 200 000 volts.cm^{-1}, et on a en fait une véritable électrophorèse de la séquence-signal, chargée positivement, vers l'intérieur de l'organite, lui-même chargé négativement. La chaîne polypeptidique est progressivement enfilée à travers le tunnel et elle prend, petit à petit, sa configuration tertiaire définitive grâce à l'aide de protéines-chaperons spécifiques des mitochondries et des plastes (voir plus loin). À la différence des mitochondries, la pénétration de la séquence-signal des protéines destinées au stroma des chloroplastes ne peut pas faire intervenir de champ électrique, car il est inexistant à ce niveau ; d'autres mécanismes doivent donc exister.

Au sein des organites, des protéases particulières (**signal-peptidases**) clivent la séquence-signal désormais inutile, et raccourcissent ainsi la chaîne polypeptidique. On comprend ainsi pourquoi ces protéines, une fois importées, sont devenues inaptes à une importation ultérieure dans des systèmes *in vitro*. Les protéines adressées par ce mécanisme ont plusieurs destinations possibles : 1) elles peuvent rester dans la matrice mitochondriale (cas de l'alcool déshydrogénase mitochondriale de levure, par exemple) ou dans le stroma des chloroplastes (cas de la petite sous-unité de l'enzyme RUBISCO ou de la ferrédoxine ; voir chapitre 10), 2) elles peuvent s'intégrer dans la membrane mitochondriale interne ou bien dans les membranes plastidiales internes et thylakoïdiennes, si elles possèdent des caractéristiques d'hydrophobicité adéquates, 3) elles peuvent enfin s'associer, en tant qu'éléments constitutifs ou comme protéines extrinsèques internes, aux multiples complexes membranaires qui sont enchâssés dans les membranes, et qui leur sont de fait directement accessibles.

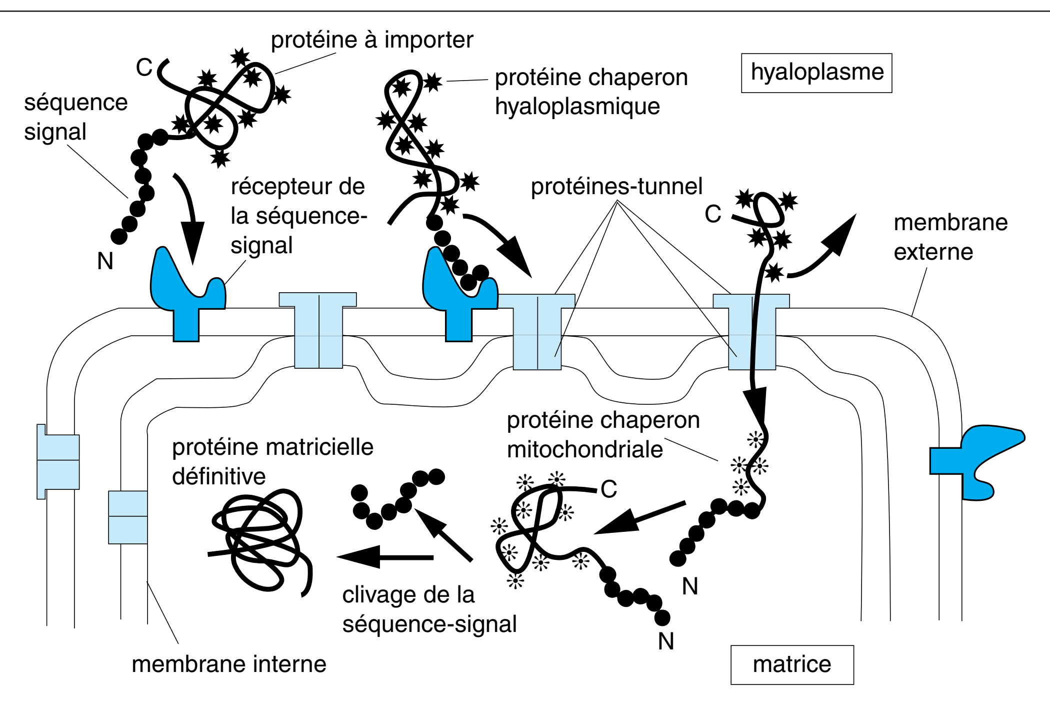


Figure 9.23

Principe de l'adressage des protéines vers la matrice mitochondriale

Noter la présence des protéines chaperons spécifiques à l'extérieur et à l'intérieur de l'organite, à la fois pour dérouler et réenrouler les chaînes polypeptidiques, avant et après le transport.

5.3.3. Importation dans les autres compartiments

Il s'agit essentiellement de l'espace intermembranaire mitochondrial et des deux faces membranaires tournées vers lui, d'une part, et de la membrane externe ; les cavités intrathylakoïdiennes des plastes sont équivalentes, du point de vue du mécanisme mis en jeu, à cet espace. L'adressage vers ce compartiment se réalise grâce à une séquence-signal double, fonctionnant en deux temps : la partie N-terminale de la chaîne polypeptidique a la même organisation que celle décrite plus haut, et son fonctionnement est identique au départ. Dans le cas des mitochondries, les événements qui suivent font encore l'objet de controverses : 1) certains auteurs pensent que la protéine gagne la matrice, où cette séquence est clivée, ce qui dévoile une deuxième séquence lui faisant suite ; celle-ci, très hydrophobe, dirigerait à son tour la protéine vers l'espace intermembranaire, en permettant le franchissement de la membrane interne ; 2) d'autres auteurs considèrent que cette deuxième séquence permet simplement un ancrage dans la membrane interne, ce qui, par glissement latéral du tunnel le plus interne, amènerait directement la protéine dans l'espace intermembranaire, sans qu'elle passe par la matrice (voir *figure* 9.24). Une fois dans cette cavité, les protéines deviennent libres ou participent à des complexes membranaires (après clivage de la séquence-signal n° 2), ou bien elles restent membranaires intrinsèques (en l'absence de clivage). Chez les chloroplastes, le premier modèle proposé est effectif pour l'importation de protéines spécifiques dans les cavités des thylakoïdes, telles que la plastocyanine.

D'autres mécanismes originaux d'adressage vers ce compartiment ont été mis en évidence, qui ne peuvent être développés ici. Enfin, certaines protéines qui ne présentent apparemment pas de signalisation particulière, passent directement du hyaloplasme dans la membrane externe des organites ; c'est le cas, par exemple, des récepteurs membranaires signalés plus haut. Ces molécules n'empruntent pas les sites de contact et toute la machinerie décrite jusqu'à présent ; les détails de ces phénomènes restent à préciser.

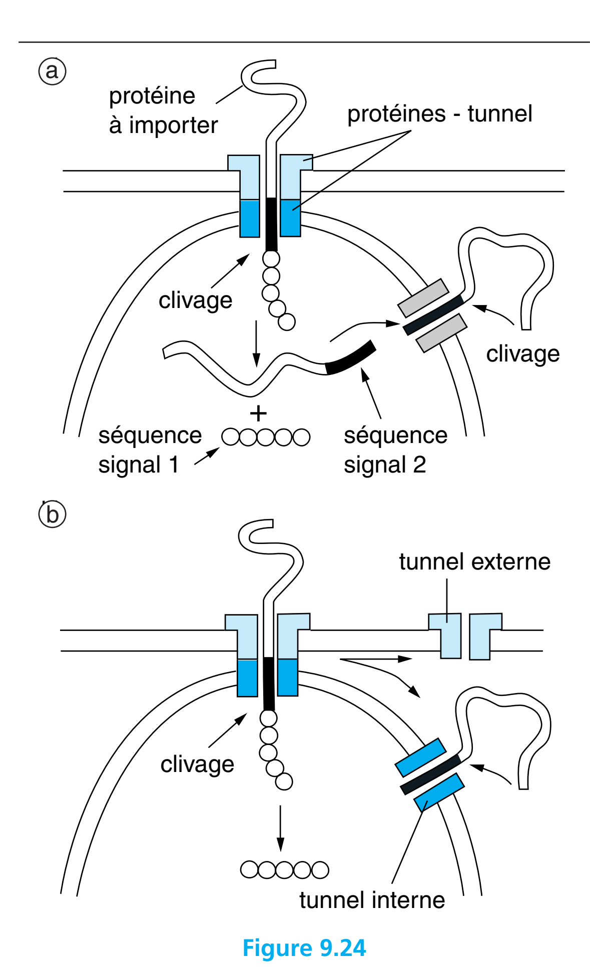


Figure 9.24

Adressage des protéines vers l'espace intermembranaire

Modèles alternatifs d'importation impliquant : **(a)** un passage des protéines à travers la matrice ; **(b)** un adressage direct des protéines par basculement du tunnel interne. Les séquences d'importation sont doubles ; la première fait toujours l'objet d'un clivage dans la matrice, tandis que la seconde peut être conservée ou non dans l'espace intermembranaire.

5.3.4. Multiplication des mitochondries et des plastes

En raison de la présence de leur génome propre, les mitochondries et les chloroplastes ne sont jamais fabriqués *de novo*. L'importation de protéines par ces organites, ajoutée à celles fabriquées sur place, conduit à l'accroissement de leur volume et de leur masse, préalable à leur multiplication au cours du cycle cellulaire. Il n'est pas rare en effet d'observer des figures de division, soit par cloisonnement transversal (c'est le cas le plus fréquent), soit par pincement. Dans le cas des mitochondries, une crête continue de part et d'autre de l'organite semble le couper en deux ; une constriction se réalise ensuite à ce niveau et la fusion des membranes externes conduit à la séparation complète en deux organites (voir *figure* 9.25). Les observations de cellules vivantes au microscope à contraste de phase montrent que ce processus est un phénomène rapide, de l'ordre de la minute, et donc difficile à étudier ; en dehors des figures cytologiques, peu de choses en fait sont connues à ce sujet. Dans le cas des chloroplastes, la division est bien visible chez les Algues unicellulaires qui n'en possèdent qu'un, comme c'est souvent le cas (*Chlamydomonas*, par exemple) ; les mécanismes intimes de ce processus ne sont pour autant pas connus.

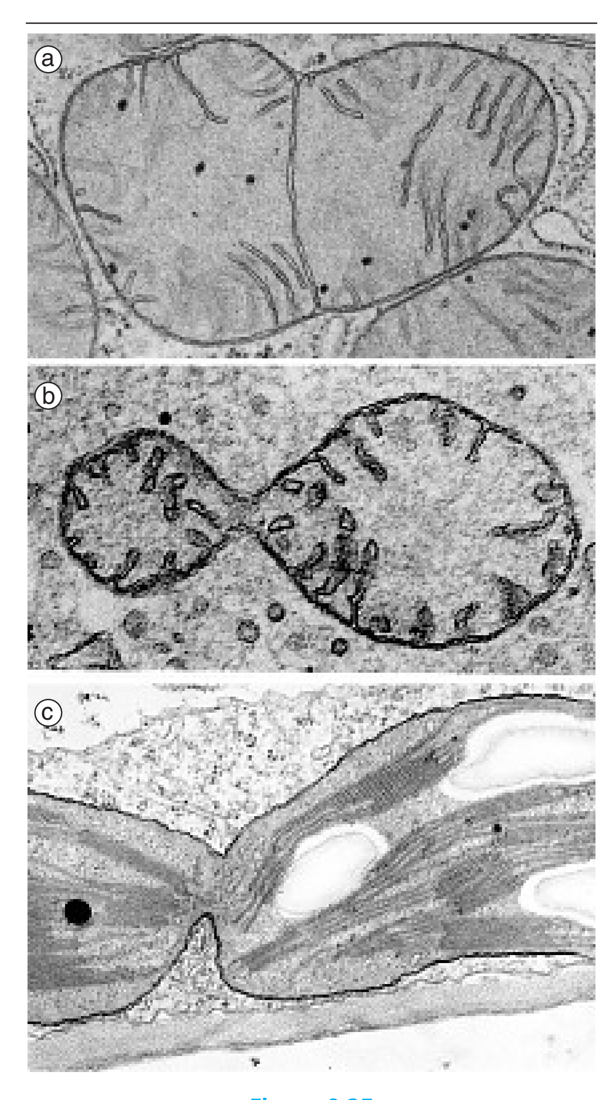


Figure 9.25

Figures de division des mitochondries et des chloroplastes

Cette division s'effectue soit par apparition d'une cloison (crête transversale) qui découpe l'organite en deux parties, soit par pincement. (Clichés Labo BG et J. Orcival, Orsay).

La reproduction des mitochondries et des plastes, par allongement suivi d'une bipartition, rappelle donc celle observée chez les Bactéries ; de même, on doit imaginer que la nécessaire duplication du matériel génétique de ces organites est coordonnée à l'accroissement de leur masse. Dans la plupart des cellules étudiées, l'accroissement du nombre des mitochondries a lieu pendant toute la durée du cycle (essentiellement donc pendant l'interphase ; voir chapitre 13). Il n'y a pas de synchronisation de la réplication de l'ADN mt avec celle de l'ADN du noyau. Ceci est particulièrement net dans le cas des ovocytes d'Amphibiens, cellules géantes ayant un stock normal d'ADN nucléaire et une quantité énorme d'ADN mt (99 % de l'ADN cellulaire total), liée à un nombre d'organites simplement proportionnel au volume cytoplasmique. De même, on a montré que la stimulation intense des cellules musculaires striées conduisait rapidement à la multiplication du nombre de leurs mitochondries (5 à 10 fois). Les mécanismes de coordination mis en œuvre dans ces cellules spécialisées et dans celles qui prolifèrent (où seul un doublement par cycle doit être obtenu), sont certainement pilotés par des gènes nucléaires puisqu'aucun gène relatif à une telle fonction n'est identifiable dans le génome mitochondrial animal, qui est entièrement séquencé (voir chapitre 4).

5.3.5. Différenciation des plastes chez les Végétaux supérieurs

Tous les types de plastes d'une espèce donnée, qui sont décrits dans les chapitres 7 et 10, se développent à partir de **proplastes** indifférenciés que l'on trouve dans les cellules méristématiques. Ces organites de petite taille (1 µm de diamètre) n'ont pas une organisation très caractéristique, mais on peut néanmoins les distinguer des mitochondries en microscopie électronique. Ils se différencient selon les tissus dans une direction bien précise en fonction de stimuli parmi lesquels la lumière est le plus puissant. Cette action s'exerce en particulier sur certains gènes portés par l'ADN chloroplastique (environ 120, au total), dont l'expression semble directement régulée par ce facteur externe. Comme pour les mitochondries, il est clair qu'il existe aussi un contrôle à travers des produits d'origine nucléaire.

5.4. Notion de « protéine-chaperon »

5.4.1. Mise en évidence des protéines dites « de choc thermique » ou « de stress »

Au cours des années 60 et 70, on mit en évidence chez toutes les cellules, que ce soit les Bactéries ou les cellules eucaryotiques les plus complexes, la fabrication abondante de protéines spécifiques dans des conditions de stress. Parmi celles-ci, une augmentation brutale de température (connue pour dénaturer les protéines) fut la première analysée, mais on montra aussi que les métaux lourds toxiques, certains alcools et les poisons métaboliques avaient le même effet. Ces protéines, évolutivement très conservées par leur taille et leur séquence primaire, et associées à des fonctions apparemment défensives, furent donc successivement appelées « **protéines de choc thermique** » et « **protéines de stress** ». Chez les Bactéries, la mutation des gènes correspondants s'accompagne d'anomalies affectant aussi bien la réplication et la transcription de l'ADN que la dégradation des protéines ou la division cellulaire. En fait, il a été montré que la plupart de ces protéines sont toujours présentes dans les cellules, mais que leur synthèse est fortement accrue lors d'un stress ; ceci suggère qu'elles accomplissent des fonctions essentielles et universelles, et pas seulement liées à la défense.

5.4.2. Propriétés et diversité des protéines-chaperons

Une association momentanée mais forte de ces protéines avec des protéines sécrétées (immunoglobulines), des protéines fabriquées au sein des chloroplastes (RUBISCO), ou bien celles intervenant dans la construction des ribosomes au sein des nucléoles, a ensuite été mise en évidence. Petit à petit, l'idée que ces protéines avaient un rôle à jouer dans la synthèse et le repliement correct des autres protéines s'est fait jour. Deux grandes familles de molécules de ce type existent, sur la base de leur masse moléculaire : celles dites HSP 70 (pour ***Heat Shock Proteins***), qui semblent fonctionner à l'état de molécules individuelles, et celles dites HSP 60 et HSP 10, fonctionnant toujours ensemble ; ces dernières forment en effet de gros complexes supramoléculaires (900 kDa) ayant la forme de deux anneaux superposés.

Une caractéristique commune à toutes ces protéines est qu'elles sont capables d'hydrolyser l'ATP en présence de protéines dénaturées. Le mécanisme suivant est proposé : les protéines dénaturées, ainsi que celles en cours de synthèse et n'ayant pas encore acquis leur configuration définitive (voir plus loin), se lient aux HSP par leurs groupements hydrophobes et subissent ensuite plusieurs cycles de liaison et de séparation consommant de l'ATP. Cette fonction très dynamique des HSP conduit progressivement les protéines liées à acquérir leur conformation tertiaire définitive, qui est celle correspondant à leur efficacité biologique optimale. Une telle activité de repliement correct des chaînes polypeptidiques *in vivo* était totalement nouvelle car on pensait depuis les années 60, sur la base d'expériences *in vitro*, que celles-ci mettaient spontanément en place leurs divers niveaux de structure, tout étant inscrit dans la séquence des acides aminés, et donc dans leurs gènes.

Il y a, en effet, un problème au sein de la cellule, pour positionner à la fois rapidement et correctement les segments hydrophobes au cœur des protéines hydrosolubles, au moment de (ou juste après) leur synthèse. Les HSP aident à réaliser ce processus en le ralentissant, grâce à leur fixation sur ces segments et à l'immobilisation (ainsi que l'isolement) des protéines en cours de fabrication. En permettant de façon passive que de multiples combinaisons soient testées jusqu'à ce que la configuration thermodynamiquement la plus stable soit obtenue, elles minimisent les risques de repliements incorrects et la formation d'agrégats. Cette propriété est à l'origine du nom actuel donné à cette famille de protéines particulières : les **protéines-chaperons**. L'enjeu pour les cellules doit être important, car ces molécules dépensent une grande quantité d'énergie pour assurer cette activité.

5.4.3. Localisation et rôles dans les cellules

Les HSP 70 sont présentes dans le hyaloplasme des cellules eucaryotiques, ainsi que dans le réticulum endoplasmique et les organites semi-autonomes. On trouve diverses formes de complexes HSP 60/HSP 10 au sein des organites semi-autonomes ; ceux-ci sont homologues des complexes des Eubactéries. Par contre, le hyaloplasme contient un type spécifique de ces chaperons, plus proche de ceux caractéristiques des Archébactéries que de ceux des Eubactéries. Chez toutes les Bactéries, bien évidemment, ces molécules cohabitent au sein du cytoplasme.

Les deux fonctions majeures de ces protéines concernent donc le repliement des protéines nouvellement synthétisées, qui est une fonction constitutive et normale, et la renaturation des protéines dénaturées à l'occasion d'un stress, en rapport avec les activités de défense. Au niveau des ribosomes hyaloplasmiques libres, les protéines-chaperons HSP 70 se fixent sur les protéines en cours d'élongation et piègent leurs segments hydrophobes ; ces complexes sont ensuite pris en charge par les chaperons de classe II qui finissent de mettre en forme les chaînes polypeptidiques au sein de leur grande cavité centrale. Il faut ajouter une troisième fonction importante, déjà évoquée : le transport à travers les membranes des mitochondries et des plastes. En bloquant momentanément le repliement d'une chaîne polypeptidique après sa synthèse, les HSP 70 hyaloplasmiques permettent son passage sous une forme déroulée à travers les tunnels transmembranaires ; dans un deuxième temps, les HSP 70 et les HSP 60/HSP 10 des organites participent à son repliement et aident peut-être ainsi à sa pénétration en leur sein. Dans le cas des protéines sécrétées, le rôle des HSP 70 de la lumière du réticulum est sans doute le même.

5.5. Ubiquitination et protéasomes

Les quantités des protéines dans les cellules sont déterminées à la fois par leur taux de synthèse et leur taux de dégradation, leur durée de vie pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours. Celles ayant une durée de vie très courte, présentes en très faibles quantités, sont en général des molécules à rôle régulateur, telles que les facteurs de transcription qui entraînent souvent une réaction rapide de la cellule, en réponse à des facteurs extérieurs. Certaines protéines sont aussi amenées à être très rapidement détruites, comme c'est le cas pour les cyclines, protéines régulatrices dont les quantités varient très rapidement au cours du cycle cellulaire (voir chapitre 13). Enfin, on sait que les protéines mal repliées au cours de leur synthèse (environ 1/3 de celles qui sont fabriquées !), ou anormales car résultant d'erreurs de traduction, ou bien endommagées, sont spécifiquement détruites.

La voie mise en œuvre dans cette dégradation, qui a lieu dans le hyaloplasme (et n'a rien à voir avec la voie lysosomale) est celle de l'ubiquitination et des protéasomes. L'ubiquitine est une petite protéine (76 acides aminés) très conservée

chez les Eucaryotes. L'accrochage covalent de plusieurs molécules d'ubiquitine à une protéine (sur une lysine), conduit à former une chaîne latérale constituant une étiquette qui enverra la protéine ainsi marquée vers une voie de dégradation très rapide, via des particules nommées protéasomes. Le phénomène d'ubiquitination nécessite une série d'enzymes agissant en cascade et consomme une molécule d'ATP à chaque étape d'accrochage. Il existe plusieurs voies d'ubiquitination, qui utilisent des signaux différents reconnus dans les protéines à dégrader.

Les protéasomes sont de gros complexes protéiques de 50 nanomètres de long, en forme de cylindre, présents en grande quantité dans le cytosol et le noyau. Ces particules, constituées d'un grand nombre de sous-unités identiques, fonctionnent comme des tunnels tapissés de sites hydrolytiques à l'intérieur desquels les protéines à détruire sont engagées (dans un état déroulé), après avoir été reconnues et sélectionnées grâce à leur étiquette d'ubiquitine. Les protéines dégradées par les protéasomes sont réduites à l'état de petits peptides par un mécanisme nécessitant aussi de l'ATP (l'ubiquitine est recyclée).

6. PANORAMA GÉNÉRAL DU TRAFIC MEMBRANAIRE ET PROTÉIQUE INTRACELLULAIRE

6.1. Notion de flux membranaire. L'endocytose compensatrice

Le fonctionnement du réticulum endoplasmique conduit, grâce à l'exocytose, à un apport constant de matériel membranaire à la surface des cellules. En dehors de celles qui prolifèrent, dont la taille et la surface s'accroissent de façon nette au cours du cycle, la surface de la membrane plasmique reste inchangée chez toutes les autres cellules. On a donc affaire à un état stationnaire, un équilibre dynamique impliquant un renouvellement rapide et constant de celle-ci. Chez les fibroblastes en culture, par exemple, on mesure que la moitié de la membrane cellulaire est renouvelée en trente minutes ! Afin que la surface de la cellule reste constante, toute exocytose doit être compensée par une endocytose simultanée (et inversement, d'ailleurs) : on parle d'**endocytose compensatrice**. Comme nous le verrons dans le chapitre 11, ces phénomènes peuvent être liés à la motilité des cellules, dans la mesure où les vésicules permettent aussi de transporter du matériel membranaire d'un endroit à un autre et donc de faciliter (sinon provoquer) le déplacement sur un substrat solide.

Dans le cas des cellules sécrétrices spécialisées, qui connaissent une exocytose massive et très localisée, l'expansion considérable de la membrane plasmique dans le domaine apical entraîne la nécessité de récupérer quasi instantanément une surface membranaire équivalente. Un phénomène d'endocytose compensatrice de grande ampleur y est donc observé, qui renvoie des morceaux de membrane, sous forme de multiples petites vésicules recouvertes de clathrine, vers le compartiment endosomal (voir chapitre 7). Ce dernier, à son tour, par bourgeonnement et fusion de vésicules avec les saccules golgiens, permet ainsi un recyclage des constituants membranaires précieux impliqués dans la sécrétion ; les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénomène restent encore mal connus. De toute manière, le recyclage n'est sans doute jamais complet, certains composants détériorés et non fonctionnels faisant l'objet d'une destruction définitive au sein de la cellule ; le rôle du RR consiste alors à renouveler en permanence une fraction donnée de protéines et de lipides membranaires.

En conclusion, il faut imaginer, bien loin des images statiques fournies par l'approche cytologique, que le cytoplasme des cellules eucaryotiques est le lieu d'un vaste **flux de membranes**, à la fois centrifuge et centripète, traversant et alimentant la plupart des organites cellulaires. En permettant la nutrition des cellules, leurs déplacements, leur possibilité de réaction ou l'expression de leur spécialisation fonctionnelle, par le biais de transporteurs, de récepteurs membranaires et d'une multitude de protéines de surface sans cesse renouvelées, ce flux est réellement à la base du phénomène vital.

6.2. Schéma général du routage intracellulaire

Ce schéma récapitule l'ensemble des données exposées au cours de ce chapitre, aussi bien celles concernant les protéines hyaloplasmiques à aiguillage post-traductionnel (voie générale de gauche) que celles qui suivent le mode cotraductionnel et sont engagées dans la synthèse au niveau du RR (voie générale de droite) (voir *figure* 9.26).

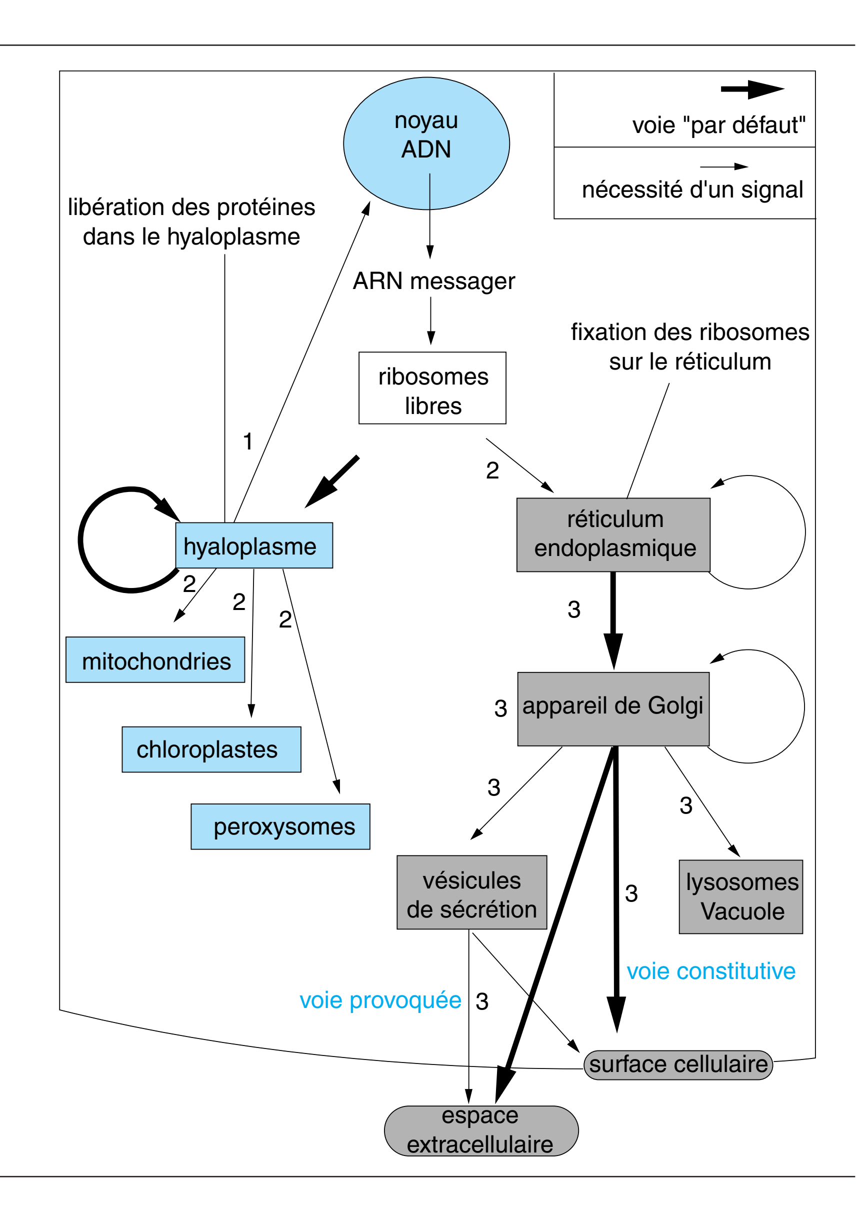
Figure 9.26

Voies de circulation des protéines chez les cellules eucaryotiques

Ce panorama met en évidence les destinations finales, les différents compartiments concernés et les modes de transport mis en jeu. **(1)** Passage par des pores ; **(2)** franchissement de bicouche lipidique ; **(3)** utilisation de vésicules porteuses.

Les flèches circulaires montrent les phénomènes de rétention au sein des compartiments.

L'engagement des protéines dans la voie de droite est un processus cotraductionnel, tandis que l'adressage vers les organites de la voie de gauche est toujours post-traductionnel.



PERSPECTIVE BIOMÉDICALE

Les maladies génétiques lysosomales

- Maladie des cellules à inclusions, ou mucolipidose de type II.

Cette maladie génétique récessive très rare est caractérisée par le fait que de nombreux types de cellules des individus atteints possèdent des inclusions de grande taille, qui sont manifestement des lysosomes contenant des matériaux non dégradés. La gravité de cette maladie de surcharge est due au fait que la plupart des hydrolases lysosomales ne sont plus séquestrées au sein des organites, mais sont sécrétées dans le milieu extérieur, y compris dans le sang, en suivant la voie classique de sécrétion qui met en jeu l'appareil de Golgi et l'exocytose. Les conséquences de cette anomalie de l'adressage protéique sont évidemment dramatiques.

L'étude *in vitro* des fibroblastes de ces patients a montré que leurs hydrolases lysosomales étaient synthétisées en quantité normale, mais qu'elles étaient dépourvues des résidus mannose-6 phosphate servant normalement d'étiquette pour leur adressage spécifique vers les lysosomes. L'origine de la maladie est donc la déficience de l'enzyme cis-golgienne impliquée dans la phosphorylation du mannose, et donc l'absence des hydrolases dans les lysosomes. De façon étonnante, tous les tissus de l'organisme ne sont pas touchés de la même façon par l'anomalie (les hépatocytes, par exemple, sont normaux), ce qui témoigne de la complexité des mécanismes qui président à l'adressage des protéines vers leurs organites.

- Autres exemples de maladies de surcharge

Le plus souvent, les maladies de surcharge sont dues à des mutations récessives dans les gènes de structure codant les hydrolases. Leurs symptômes sont très variables, en fonction du degré d'activité des enzymes affectées. Quelques exemples peuvent être donnés :

– la maladie de Pompe correspond à une déficience en une enzyme responsable de la dégradation du glycogène (glucosidase). La plupart des cellules des malades accumulent du glycogène non dégradé à l'intérieur des lysosomes, ce qui a pour conséquence une altération progressive des myofibrilles, au sein de leurs cellules musculaires squelettiques. Les enfants meurent donc d'insuffisance cardiorespiratoire au cours de leur première année.

– la maladie de Tay-Sachs est une maladie rarissime, mais très grave, qui concerne une hexosaminidase chargée de détruire spécifiquement un glycolipide membranaire abondant dans la membrane plasmique des cellules du système nerveux central (voir chapitre 5). Comme ce composé continue à être synthétisé alors qu'il ne peut plus être dégradé dans les lysosomes, il s'accumule au sein de corps résiduels dont la taille et le nombre augmentent au cours du temps, dans les neurones. Les bébés atteints sont normaux à la naissance, mais des désordres neurologiques s'installent rapidement : détériorations motrices, retard mental grave, anomalies cardiaques et respiratoires ; la mort est inéluctable et survient entre 3 et 5 ans. Un diagnostic prénatal, réalisé sur des cellules du liquide amniotique, permet de savoir si l'enfant sera atteint ou pas.

– les maladies de Gaucher (dont il existe trois formes, de gravité différente) sont liées à une déficience en glucocérébrosidase, ce qui conduit à une surcharge en glucocérébrosides dans les lysosomes des macrophages des patients. Ces derniers présentent une hypertrophie du foie et de la rate, des problèmes osseux et parfois un retard mental (dans les formes infantiles graves). Cette affection fait l'objet d'une thérapie originale basée sur l'utilisation d'enzymes exogènes injectées dans l'organisme ; sous certaines conditions, une forme purifiée et modifiée de la glucocérébrosidase peut être capturée par les macrophages (endocytose par récepteurs), et donc être dirigée vers les lysosomes où son activité normale peut s'exercer. Le coût prohibitif de ce traitement limite cependant son utilisation, et des recherches en thérapie génique sont envisagées.

Résumé

À la différence des Bactéries, les cellules eucaryotiques présentent un phénomène de compartimentation marqué. Dans la mesure où le nombre de lieux de synthèse des protéines au sein des cellules est très réduit, en comparaison avec le nombre de destinations possibles de ces molécules, le problème se pose de leur adressage précis vers leur compartiment spécifique. Il existe différents modes de transfert des protéines d'un compartiment à un autre : passage à travers des pores, franchissement direct de membranes ou bien mise en jeu de vésicules, à la suite d'événements successifs de bourgeonnement et de fusion.

Le réticulum endoplasmique est un vaste système membranaire formé de deux territoires : 1) le réticulum rugueux, présent sous la forme de lames aplaties et portant des ribosomes sur leur face externe, et 2) le réticulum lisse, constitué de tubules contournés dépourvus de ribosomes. De nombreuses cellules animales sécrètent des protéines dans le milieu extérieur ; ce processus a été étudié au moyen d'approches cytologiques (autoradiographie), physiologiques (fractionnement cellulaire), et moléculaires. On a mis en évidence un processus dit d'insertion cotraductionnelle, dans lequel une séquence hydrophobe N-terminale de la protéine à sécréter sert de signal d'adressage vers le réticulum rugueux ; la particule dite PRS sert de relais entre les ribosomes hyaloplasmiques et les membranes du réticulum. Ce phénomène concerne aussi les protéines destinées à la membrane plasmique et aux lysosomes.

Au sein du réticulum rugueux, les protéines subissent plusieurs modifications, en particulier le clivage de la séquence-signal et une glycosylation sur certains résidus asparagine. Les fonctions majeures du réticulum lisse sont : 1) la synthèse des lipides membranaires, qu'il incorpore dans sa propre bicouche au cours de leur fabrication, ce qui conduit à augmenter sa surface, et 2) la détoxification de composés généralement de nature hydrophobe, grâce à des enzymes d'hydroxylation qui les rendent hydrosolubles et excrétables.

L'appareil de Golgi est un système membranaire complexe formé de nombreux dictyosomes réunis les uns aux autres par des tubules. Chaque dictyosome est formé d'un empilement polarisé de saccules qui échangent du matériel grâce à de multiples vésicules périphériques. Cet organite, qui reçoit les protéines provenant du réticulum rugueux, représente un intermédiaire capital dans le processus de sécrétion. Il est le lieu de nouvelles modifications biochimiques des protéines : 1) poursuite de la glycosylation, parfois très importante, et 2) clivages protéolytiques intervenant dans l'activation de nombreuses enzymes et hormones. Chez les Végétaux et les Champignons, l'appareil de Golgi est impliqué dans la synthèse de glycoprotéines et de polysaccharides pariétaux.

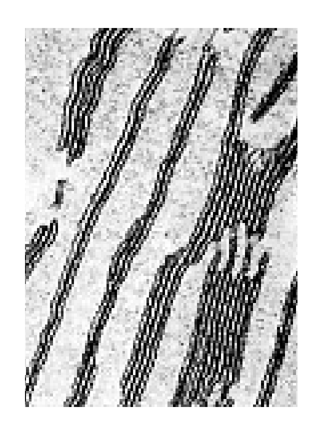
L'exocytose des protéines se fait selon deux voies, dont l'une est permanente et commune à toutes les cellules (voie constitutive), et l'autre est réservée aux cellules sécrétrices spécialisées qui répondent à l'action de stimuli précis (voie contrôlée). Les lysosomes sont les organites pour lesquels les mécanismes moléculaires de l'adressage sont les mieux connus ; ils sont basés sur l'étiquetage des protéines qui leur sont destinées par un résidu glucidique particulier, et sur l'intervention de récepteurs membranaires spécifiques.

L'adressage des protéines vers le noyau, les organites semi-autonomes et les peroxysomes est basé sur un principe très différent ; un mécanisme post-traductionnel fait intervenir, pour chacun de ces organites, un type particulier de séquences-signal. Celles-ci sont reconnues, au niveau de chaque compartiment, par des récepteurs membranaires qui délivrent la protéine à importer à un système de protéines-canal ou de pores, dans le cas du noyau. Les mécanismes en jeu dans les organites semi-autonomes sont complexes car plusieurs destinations y sont possibles. La cellule eucaryotique fait enfin l'objet d'un intense trafic membranaire, l'exocytose permanente devant être compensée par une endocytose dont le rôle est de maintenir constante la surface de la membrane plasmique.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Donner une définition du routage des protéines mettant en évidence les problèmes posés par la compartimentation dans les cellules eucaryotiques.
2. Décrire les différents modes de transport des protéines d'un compartiment à un autre au sein des cellules eucaryotiques.
3. Donner les caractéristiques cytologiques principales du réticulum endoplasmique rugueux et du réticulum endoplasmique lisse.
4. Nommer les diverses catégories de protéines sécrétées chez les Vertébrés.
5. Pour quelles raisons les cellules pancréatiques exocrines ont-elles constitué historiquement un matériel privilégié pour l'étude de la voie de sécrétion des protéines ?
6. Qu'appelle-t-on microsomes ? quel est leur intérêt dans l'étude des processus biochimiques de synthèse des protéines sécrétées ou membranaires ?
7. Quelle est la définition du processus d'insertion cotraductionnelle des protéines dans le réticulum endoplasmique rugueux ?
8. De quelle façon la particule dite PRS fonctionne-t-elle comme intermédiaire entre les ribosomes hyaloplasmiques et les membranes du réticulum ?
9. Quelle est la caractéristique physicochimique commune à toutes les séquences-signal des protéines sécrétées, membranaires ou lysosomales ?
10. Décrire le processus de N-glycosylation des protéines qui se déroule dans le réticulum endoplasmique rugueux.
11. Comment fonctionnent les séquences d'ancrage caractéristiques des protéines membranaires qui sont mises en place dans le réticulum, au cours de leur synthèse ?
12. Qu'appelle-t-on membrane biogénique ? quels sont les mécanismes biochimiques permettant la synthèse des lipides membranaires au sein du réticulum endoplasmique lisse ?
13. En quoi peut-on dire que le réticulum endoplasmique lisse est un système qui participe à la détoxification de certains composés chimiques au sein de la cellule ?
14. Décrire l'organisation générale des dictyosomes et de l'appareil de Golgi.
15. Pourquoi peut-on parler de structure enzymatiquement polarisée dans le cas d'un dictyosome ?
16. Quelles différences y a-t-il entre entre les voies de sécrétion constitutive et de sécrétion contrôlée ? dans quels types de cellules rencontre-t-on ces voies ?
17. Nommer les différentes catégories de macromolécules produites chez les Animaux grâce à la glycosylation qui se déroule au sein du réticulum rugueux et des saccules golgiens.
18. Décrire un exemple de clivage protéolytique ayant lieu dans l'appareil de Golgi et dans les vésicules de sécrétion.
19. Comment les hydrolases lysosomales sont-elles étiquetées puis reconnues, pour se retrouver finalement toutes rassemblées au sein d'une même famille de vésicules golgiennes ?
20. Quelles sont les caractéristiques principales des séquences-signal d'adressage portées par les protéines nucléaires ?
21. Rappeler les étapes et les mécanismes de l'importation des protéines dans la matrice mitochondriale.
22. Qu'appelle-t-on protéines-chaperons ? quelles sont les fonctions de cette grande famille de molécules au sein des organites et/ou du hyaloplasme, chez les Procaryotes et les Eucaryotes ?
23. Quel est le rôle fondamental de l'endocytose dans la régulation du flux membranaire au sein de la cellule eucaryotique ?



Chapitre 10

CONVERSION DE L'ÉNERGIE : MITOCHONDRIES ET CHLOROPLASTES. Les peroxysomes

L'ensemble des activités cellulaires décrites jusqu'à présent, qu'elles soient métaboliques, osmotiques ou mécaniques, consomment de l'énergie, dont la fourniture est une condition *sine qua non* de la vie (voir chapitre 1). Toutes les cellules actuelles utilisent la même énergie chimique, sous la forme de molécules d'ATP. Les biochimistes ont évalué les besoins énergétiques quotidiens chez l'Homme à plusieurs dizaines de kilogrammes de ce composé ; cette estimation montre clairement que l'ATP ne peut faire l'objet d'un stockage dans l'organisme, mais qu'il doit sans cesse être renouvelé. Bien que la glycolyse produise de l'ATP de façon ubiquitaire dans les cellules, l'essentiel de la production énergétique chez les Eucaryotes est lié à la présence d'organites spécialisés : les mitochondries et les chloroplastes.

Les **mitochondries** et les **chloroplastes** présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes qui conduisent à les traiter en parallèle. Nous avons vu dans le chapitre précédent que ces organites ont une position particulière dans les cellules et qu'ils se distinguent de tous les autres systèmes membranaires déjà décrits : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes… Porteurs d'une information génétique propre et d'une machinerie assurant son expression autonome (voir chapitre 4), ils se situent à l'écart du vaste flux membranaire qui traverse les cellules eucaryotiques. Bien que cette information génétique soit réduite, sa seule existence implique des modalités très particulières de leur biogenèse ; cette dernière a été traitée, sous ses différents aspects, dans le chapitre 9. Enfin, nous comprendrons dans le chapitre 16, en quoi la situation commune, et si particulière, de ces organites est liée à une même origine évolutive : ils descendent en effet d'ancêtres procaryotiques ayant été «annexés et domestiqués» par les précurseurs des cellules eucaryotiques modernes.

Les **peroxysomes** sont des organites unimembranaires différant des précédents à de nombreux égards. Cependant, comme ils interagissent métaboliquement de façon importante avec eux, et que leurs fonctions oxydatives doivent être comparées à celles des mitochondries pour être bien comprises, nous les étudierons aussi dans ce chapitre.

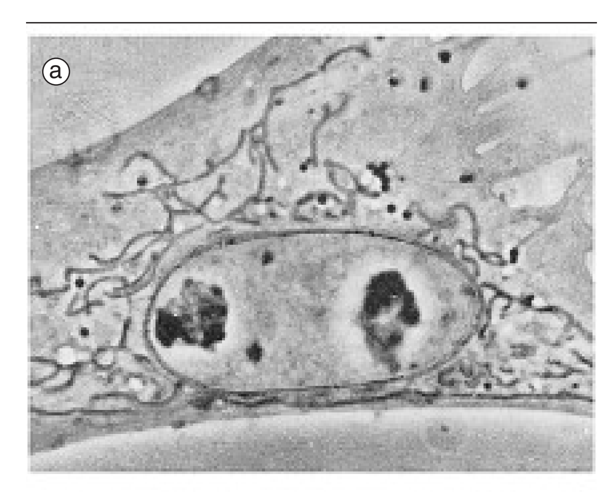
1. MORPHOLOGIE ET ULTRASTRUCTURE DES MITOCHONDRIES ET DES PLASTES

1.1. Données de la microscopie photonique

1.1.1. Mitochondries

Après une coloration adéquate (vitale, au nitrobleu de tétrazolium – voir plus loin –, ou bien après fixation, au bleu de toluidine, par exemple), ces organites apparaissent sous forme de granules plus ou moins allongés : globulaires (de 0,5 à 1 µm de diamètre), ou filamenteux, jusqu'à 10 µm de

long (voir *figure* 10.1 et *figure* 3.16). Généralement répartis dans l'ensemble du hyaloplasme, ils présentent parfois des regroupements (dans certains ovocytes) ou une localisation préférentielle, en relation avec des besoins énergétiques évidents ; quelques exemples sont donnés plus loin. L'utilisation combinée du microcinéma et du contraste de phase montre que le compartiment mitochondrial (le **chondriome**), est très dynamique (mouvements, fragmentation, fusion des organites) et il est donc parfois difficile de définir clairement «l'entité mitochondriale». On considère en général que le nombre et le volume total des mitochondries sont proportionnels au volume cellulaire : à titre d'exemple, environ 1 500 mitochondries occupent 20 % du volume d'un hépatocyte.



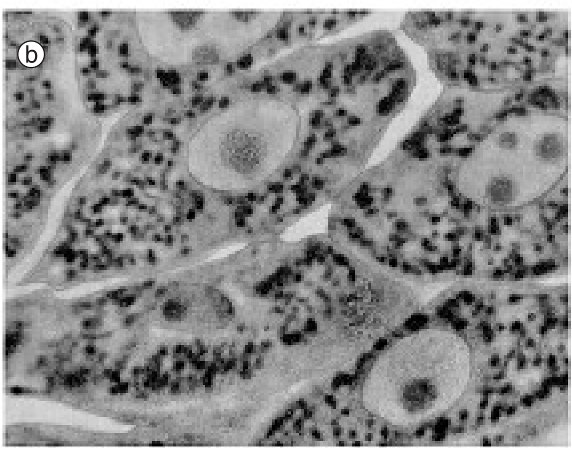


Figure 10.1

Aspect des mitochondries animales en microscopie photonique

(a) cellule animale en culture : fibroblaste de poulet ; **(b)** cellules hépatiques de rat (cryofixation et cryomicrotomie). Les mitochondries sont ici réparties de façon homogène dans le cytoplasme. Clichés Labo. BG, Orsay.

1.1.2. Plastes

Chez les Végétaux supérieurs, dans les cellules chlorophylliennes de parenchyme foliaire, par exemple, les **chloroplastes** apparaissent comme des organites de couleur verte et de forme ovoïde ou lenticulaire. Mesurant de 5 à 10 µm de long, ils sont très nombreux dans la cellule et en constituent le compartiment le plus volumineux : le **plastidome** (voir *figure* 10.2). Ils présentent une organisation interne granulaire, dont on verra la signification ultrastructurale plus tard. Les tissus non colorés des Végétaux verts (comme les racines et les tissus profonds ou de réserve) ne montrent pas de chloroplastes différenciés tels que ceux que l'on vient de décrire, mais on peut y observer des organites qui leur sont apparentés.

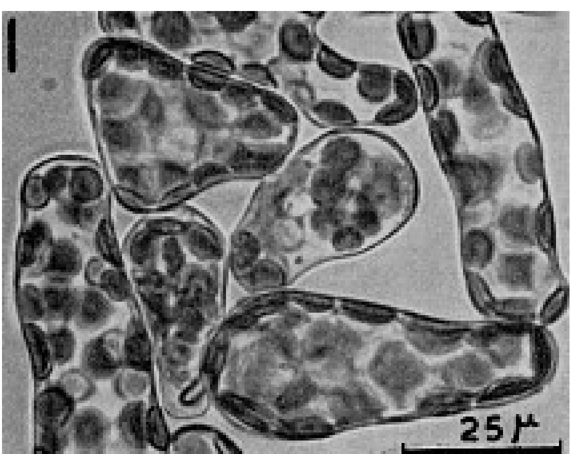


Figure 10.2

Aspect des chloroplastes des Végétaux supérieurs en microscopie photonique

Chloroplastes observés dans des cellules isolées d'euphorbe. Cliché J. Orcival (Orsay).

Les cellules méristématiques contiennent des plastes incolores, dits **proplastes**, dont la taille est à peine supérieure à celle des mitochondries, mais dont la morphologie est assez différente. Par leur structure très simple et leur physiologie, ils sont tout à fait distincts de ceux vus dans les tissus chlorophylliens, et ils représentent en réalité une forme indifférenciée de ces organites. Dans certains tissus non verts mais naturellement colorés (par exemple, la pulpe du fruit de la tomate), les cellules contiennent des plastes ayant accumulé des pigments rouges, cristallisés sous forme d'aiguilles de lycopène (un isomère du carotène) : ce sont des **chromoplastes**. Les **leucoplastes** sont des plastes

non pigmentés, rencontrés dans des cellules sécrétrices d'essences ou de résines (chez le pin, par exemple). Enfin, dans divers organes de réserve, on décrit d'autres types de plastes spécialisés dans l'accumulation de molécules variées : **amyloplastes**, **oléoplastes** et **protéoplastes** (voir chapitre 7). Bien que d'aspect et de fonctions très différentes, tous les plastes d'une même plante appartiennent à la même famille et contiennent la même information génétique.

Contrairement aux mitochondries, les chloroplastes montrent une grande diversité de couleurs, de tailles, de formes ou d'organisations internes, en fonction de l'origine spécifique du végétal. Chez les Algues, en particulier, ils prennent des aspects très curieux : cupulaires, étoilés, spiralés, annulaires, lamellaires, réticulés… Leur nombre par cellule y est aussi très variable, allant de un à plusieurs centaines ou milliers ; ils ne manifestent par contre pas de spécialisation tissulaire, comme c'est les cas chez les Végétaux supérieurs (voir *figure* 10.3).

1.2. Données ultrastructurales

1.2.1. Mitochondries

L'ultrastructure des mitochondries (connue depuis 1953) est caractérisée par l'existence de deux membranes limitantes, représentant environ 40 % des membranes cellulaires dans un hépatocyte (voir *figures* 10.4, 9.2 et 9.25). La **membrane externe** est uniforme et continue, d'épaisseur voisine de 7 nm ; la **membrane interne** en est séparée par un **espace intermembranaire** large de 10 à 20 nm. L'épaisseur de cette dernière est de 5 à 6 nm, ce qui témoigne d'une différence de composition chimique importante par rapport à la membrane externe. La membrane interne émet vers l'intérieur de l'organite des replis serrés appelés **crêtes**, dont l'intérieur est en continuité avec l'espace intermembranaire ; sa surface est donc beaucoup plus étendue que celle de la membrane externe (5 fois plus, dans un hépatocyte). Comme on le verra plus loin, le nombre et la forme de ces crêtes sont très variables selon les tissus. De façon assez générale, celles-ci sont perpendiculaires au grand axe de l'organite ; elles traversent parfois celui-ci de part et d'autre, mais le plus souvent elles ont une extrémité libre (crêtes lamellaires). Chez les Protozoaires Ciliés, les crêtes sont toujours tubulaires (voir *figure* 7.14).

L'intérieur de la mitochondrie est appelé **matrice mitochondriale** ; très concentrée et d'aspect finement granuleux, on peut aussi y distinguer des structures figurées de taille importante. Ces inclusions sont les suivantes :

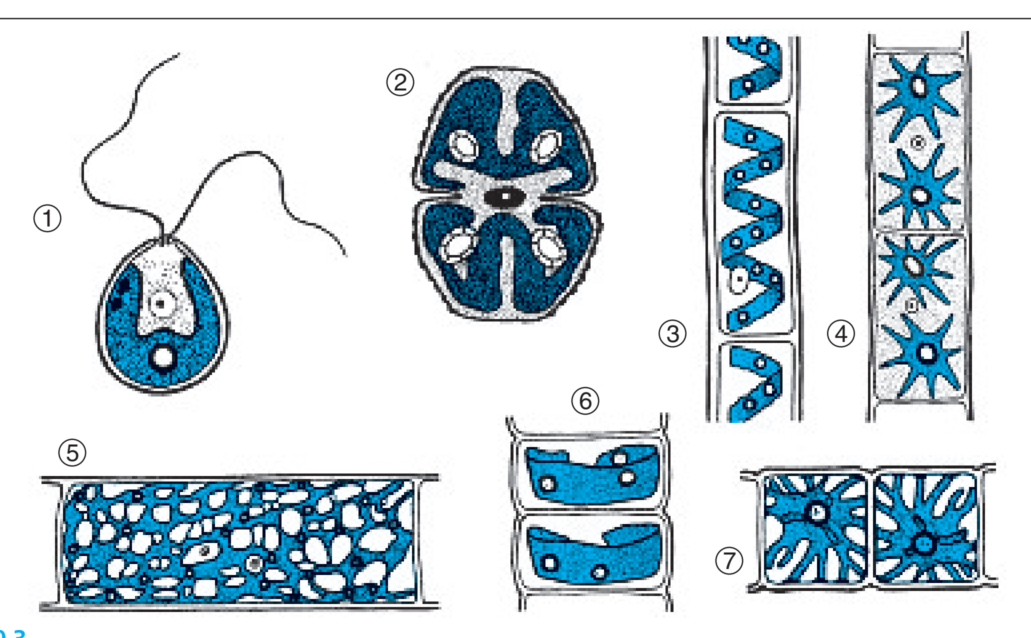
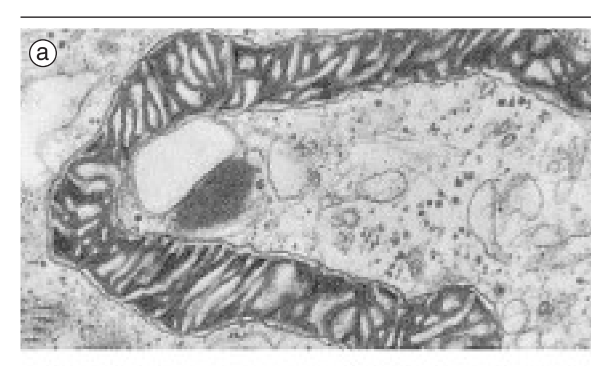


Figure 10.3
Diversité des chloroplastes observés chez quelques Algues vertes
(1) *Chlamydomonas*, **(2)** *Cosmarium*, **(3)** *Spirogyra*, **(4)** *Zygnema*, **(5)** *Acrosiphonia*, **(6)** *Ulothrix*, **(7)** *Prasiola*.



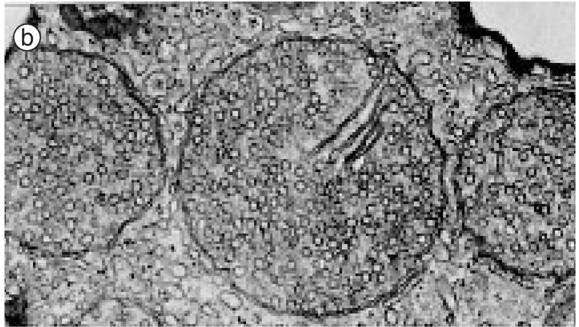




Figure 10.4

Ultrastructure de divers types de mitochondries

(a) cellules musculaires ; **(b)** cellules sécrétrices d'hormones stéroïdiennes (cortico-surrénale de rat) ; **(c)** cellules de Champignons. Clichés Labos. BG, MVE et Labo. BC4 (R. Charret), Orsay.

– de nombreux granules opaques aux électrons, de 15 nm de diamètre : les **mitoribosomes** (voir *figure* 10.5). Ils interviennent dans la synthèse protéique mitochondriale se réalisant à partir du matériel génétique local (voir chapitre 4) ;

– des granules de grande taille, qui représentent des **réserves lipoprotéiques**, accumulées par les cellules dans certaines conditions physiologiques ;

– des **cristaux protéiques** de forme géométrique, avec un réseau très régulier, et envahissant parfois complètement la matrice ; ils traduisent l'accumulation d'un nombre limité de protéines ;

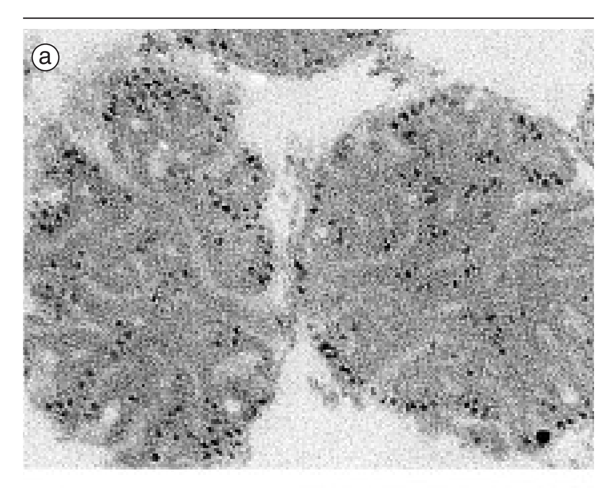
– des cristaux de **substances minérales**, généralement des phosphates de Ca^{2+} ou Mg^{2+} (souvent accumulés dans des conditions pathologiques) ;

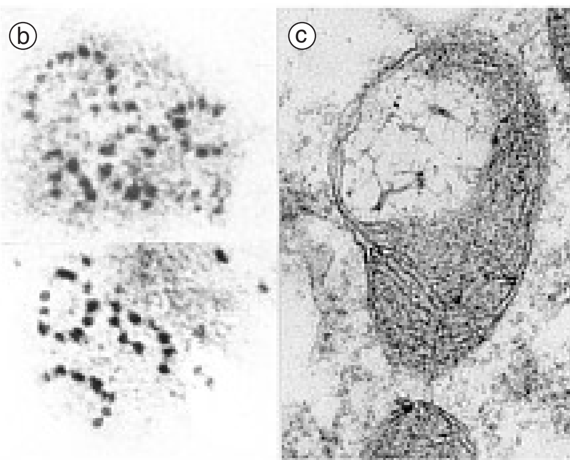
– des structures fibreuses et mal définies, localisées dans une zone claire de la matrice. L'histochimie et la biochimie ont montré qu'il s'agit de molécules d'**ADN**. C'est le génome des mitochondries (**nucléoïde**), qui en fait des organites semi-autonomes du point de vue de leur biogenèse (voir chapitre 4).

D'autres techniques d'observation complètent cette approche ultrastructurale. En cryodécapage, l'examen de répliques montre la présence de granules de 5 à 10 nm de diamètre enchâssés dans une bicouche lipidique, et confirme la structure générale asymétrique des membranes biologiques. La coloration négative de fragments de la membrane interne fait apparaître des sphères de 10 nm de diamètre, accrochées sur sa face interne par un fin pédoncule (voir *figure* 10.5) ; on sait actuellement que c'est à leur niveau que se réalise la synthèse d'ATP dans les mitochondries : ce sont les complexes de l'**ATP synthétase**.

Le schéma qui vient d'être décrit est le plus fréquent, mais il existe une véritable **différenciation mitochondriale** en fonction des tissus dans lesquels on observe ces organites. Cette diversité se traduit au niveau de leur nombre et de leur forme, mais aussi de la taille, de l'orientation et de la disposition des crêtes internes. À côté de mitochondries globulaires, on en observe de très longues (> 10 µm) et ramifiées, en particulier quand on examine des coupes épaisses en microscopie à très haut voltage (voir chapitre 2). Mais c'est surtout la forme des crêtes qui est sujette à une importante variation : relativement lâches dans les hépatocytes, elles sont serrées dans les cellules musculaires ou dans le **tissu adipeux gris** ; elles sont de section triangulaire et longitudinales dans certaines cellules nerveuses ; elles apparaissent tubulaires dans les glandes sécrétant des hormones stéroïdes (cortico-surrénales) (voir *figure* 10.4).

De façon générale, le nombre et la taille des mitochondries, mais surtout la surface de leurs membranes internes, sont d'autant plus importants que le métabolisme cellulaire est élevé ; dans certaines fibres musculaires, le volume de ces organites atteint 40 % du volume cellulaire. Diverses conditions pathologiques, comme une carence en cuivre ou en vitamines, conduisent à des anoma-





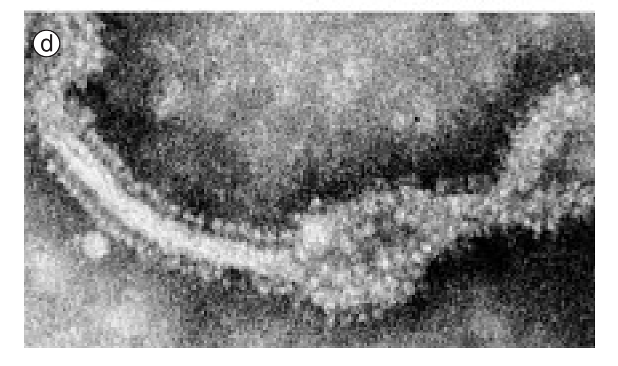


Figure 10.5

Particularités ultrastructurales des mitochondries

(a) mitoribosomes de *Tetrahymena* ; **(b)** et **(c)** mitoribosomes (associés en polysomes) et ADNmt (sous la forme de structures fibreuses diffuses) présents au sein de la matrice mitochondriale chez la levure ; **(d)** particules F0/F1 (ATP synthétases) ; des lambeaux de la membrane interne sont observés après coloration négative (noter la richesse en particules pédicellées : 3 000/µm^2). Clichés Labo. BC4 , Orsay (J. André et R. Charret).

lies telles que le gigantisme ; un jeûne prolongé peut induire un changement d'orientation des crêtes, qui deviennent longitudinales. Dans les cellules de levure, pendant la phase de culture exponentielle, toutes les mitochondries (on en compte jusqu'à 50 pendant la phase stationnaire) se rassemblent en un ou deux « super-organites », des mitochondries géantes dont la forme est très tortueuse et ramifiée. Un cycle semblable de fusion et de fragmentation est décrit chez d'autres microorganismes (*Euglena*, *Chlamydomonas*), mais il est fonction de la phase du cycle cellulaire et non pas de la vitesse de croissance.

Certaines cellules présentent un regroupement des mitochondries en des endroits privilégiés, ce qui témoigne d'une coopération fonctionnelle orientée en général dans le sens d'une fourniture maximale d'énergie. La contraction musculaire, le battement des cils et des flagelles, le pompage des métabolites à travers les membranes sont des processus gros consommateurs d'ATP, lequel est fourni par les mitochondries. Dans les spermatozoïdes, la base du flagelle est entourée d'un manchon spiralé et serré de mitochondries dont le rôle est évident ; dans les fibres musculaires, les myofibrilles sont littéralement enveloppées de mitochondries aux crêtes très serrées ; enfin, dans les cellules des épithéliums absorbants (par exemple, les cellules des tubules contournés proximaux des reins), des mitochondries filamenteuses sont disposées perpendiculairement à la face basale, dans de longues invaginations de la membrane plasmique dont le rôle est de faciliter les échanges entre cytoplasme et milieu extérieur.

1.2.2. Chloroplastes des Végétaux supérieurs

Leur ultrastructure a une organisation très voisine, dans son principe, de celle des mitochondries. Ils sont entourés par une enveloppe constituée de deux membranes de 6 nm d'épaisseur, délimitant un espace intermembranaire étroit de 10 à 15 nm. L'intérieur du chloroplaste est constitué par le **stroma**, à structure finement granuleuse, dans lequel baignent des systèmes membranaires très développés, orientés selon le grand axe de l'organite et constitués en fait de sacs clos aplatis appelés **thylakoïdes**. Certains de ces sacs constituent des empilements réguliers d'une dizaine de disques de 0,3 à 0,6 µm de diamètre étroitement accolés les uns aux autres ; on appelle ces structures des **grana** (reconnaissables en microscopie photonique sous forme de grains verts dans les chloroplastes).

Les grana sont reliés les uns aux autres par de longs sacs aplatis très polymorphes et communiquant les uns avec les autres, appellés **thylakoïdes intergranaires** (voir *figure* 10.6).

Contrairement aux crêtes mitochondriales, tous les thylakoïdes sont clos et indépendants de la membrane interne du chloroplaste ; par rapport à ces crêtes, leur cavité constitue donc un compartiment nouveau et original, dont nous verrons plus tard l'importance fonctionnelle. Les membranes des 40 à 60 granums d'un seul chloroplaste représentent une surface 500 fois supérieure à celle de la membrane externe de l'enveloppe. Les autres structures rencontrées dans le stroma sont les suivantes :

– des **grains d'amidon**, apparaissant en coupe comme de grands trous clairs ;
– des granules osmiophiles, constitués de lipides : les **plastoglobules** ;
– des **plastoribosomes**, dont la taille est voisine de celle des ribosomes mitochondriaux ;
– des structures fibreuses localisées dans des zones plus claires du stroma et représentant les molécules d'**ADN** du génome propre de ces organites.

Le cryodécapage révèle ici aussi l'existence de particules intramembranaires de divers types, selon la membrane qui est observée. On met en évidence une nette asymétrie de la membrane des thylakoïdes, qui possède en effet des particules de grosse taille (12 à 16 nm) associées à la face tournée vers l'intérieur, ainsi que d'autres de taille plus modeste (8 à 10 nm) associées à la face tournée vers le stroma. Sur des lambeaux de ces membranes, la coloration négative fait de plus apparaître des particules pédicellées de 10 nm, semblables à celles décrites sur les crêtes mitochondriales ; situées du coté du stroma, elles représentent ici aussi des complexes enzymatiques de type ATP synthétases. Une comparaison de l'organisation générale des mitochondries et des chloroplastes est présentée dans la *figure* 10.7.

Pour terminer, il faut signaler que la diversité des chloroplastes des Algues, soulignée plus haut, n'est pas seulement morphologique ; elle se retrouve aussi au niveau de leur organisation fondamentale puisque, dans certains groupes, ils présentent trois, voire quatre membranes limitantes. Cette caractéristique remarquable sera détaillée dans le chapitre 15 ; elle peut en effet être mise en rapport avec une origine phylogénétique particulière pour chacun de ces groupes.

1.3. Apports du fractionnement cellulaire à l'étude des mitochondries et des chloroplastes

1.3.1. Mitochondries

Elles sont aisément sédimentables par centrifugation d'un surnageant postnucléaire (15 minutes à 10 000 g). Divers traitements utilisant des déter-

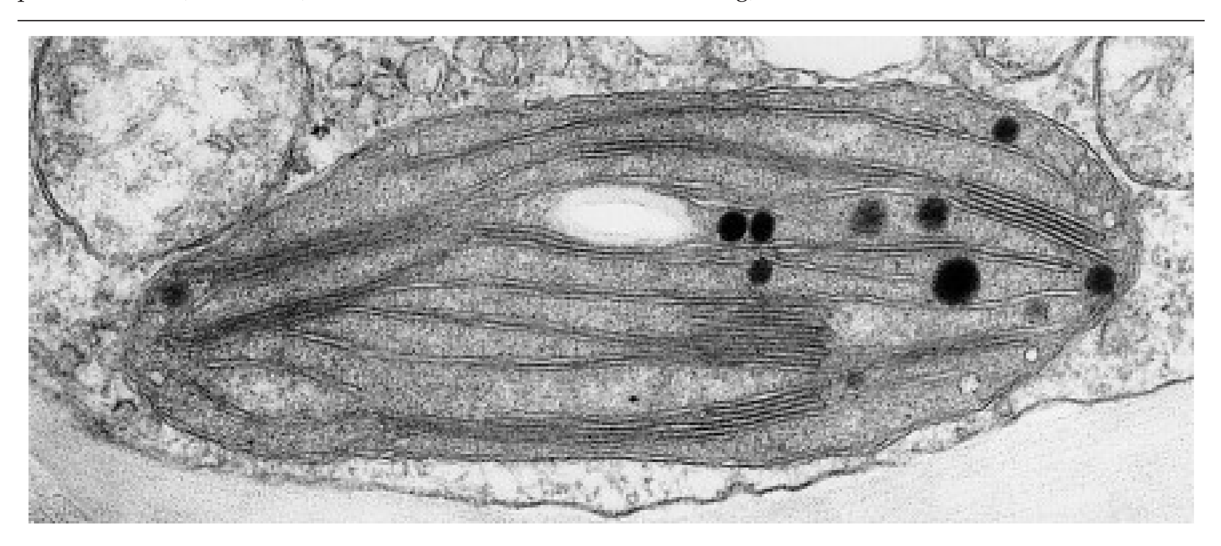


Figure 10.6

Ultrastructure d'un chloroplaste de cellule de Végétal supérieur

Noter les lamelles thylakoïdiennes, les empilements des saccules granaires, la présence d'un grain d'amidon (zone claire) et de granules osmiophiles (lipides) dans le stroma. Cliché J. Orcival (Orsay).

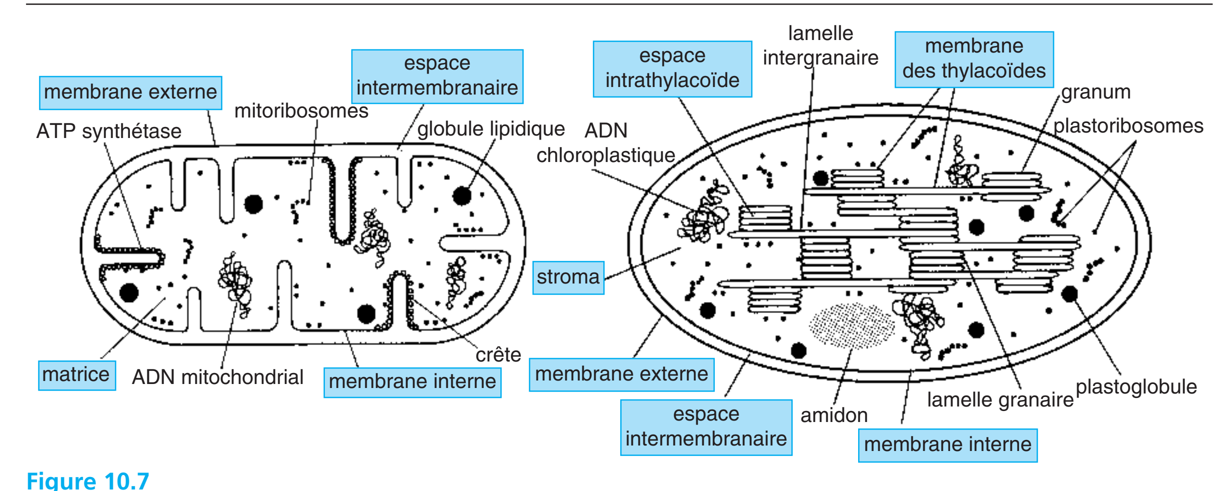


Figure 10.7

Schémas comparés d'une mitochondrie et d'un chloroplaste

Noter le plan d'organisation commun (enveloppe, ADN, ribosomes, etc.) et les différences portant sur les systèmes membranaires internes. Les noms des différents compartiments de chaque organite sont indiqués en couleur.

gents spécifiques ou des chocs osmotiques, permettent de décortiquer complètement ces organites en tous leurs compartiments, de la même façon qu'une cellule peut être décomposée en ses organites. On peut donner quelques exemples d'apports du fractionnement des mitochondries.

• Leur membrane externe est très riche en une protéine nommée **porine**, qui forme des pores laissant passer des molécules dont la masse moléculaire va jusqu'à 6 kDa ; cette membrane est donc très perméable à tous les métabolites. De façon étonnante, cette molécule remarquable est semblable à une protéine rencontrée dans la membrane externe des Bactéries Gram négatives (voir chapitre 16).

• Leur membrane interne est dépourvue de cholestérol, mais elle contient un phospholipide unique, le **diphosphatidyl-glycérol** (cardiolipide), molécule que seul cet organite est capable de synthétiser. Sa composition en protéines (70 à 80 %) et en lipides (20 à 30 %) est très particulière, à la fois quantitativement et qualitativement. Cette propriété, sans doute liée à sa richesse en un grand nombre de transporteurs différents (voir plus loin), est responsable de sa faible fluidité.

• Les mitoribosomes, l'ADN mitochondrial, des ARN, de nombreuses enzymes spécifiques, etc. sont aisément purifiables à partir d'extraits de la matrice. La concentration protéique de celle-ci atteindrait la valeur considérable de 500 mg/ml.

On démontre ainsi de façon reproductible que certaines enzymes sont exclusivement localisées dans un compartiment donné ; celles-ci servent ensuite de moyen rapide de caractérisation de fractions cellulaires isolées. Une notion importante et générale se dégage donc de ces travaux, à savoir celle de **marqueur enzymatique**.

1.3.2. Chloroplastes

L'analyse chimique des différents compartiments des chloroplastes est également conduite grâce aux techniques du fractionnement cellulaire. Celles-ci sont relativement aisées en raison de la grande taille de ces organites, de leur abondance et de leur couleur, qui permettent des contrôles de pureté rapides ; le matériel privilégié pour ce genre d'approche a longtemps été la feuille d'épinard. Comme dans le cas des mitochondries, on peut faire éclater osmotiquement les chloroplastes et purifier les différents compartiments qui les constituent grâce à des centrifugations appropriées en gradient de saccharose. C'est ainsi qu'on montre, par exemple, que les **pigments photosynthétiques** des Végétaux supérieurs sont uniquement localisés dans les membranes des thylakoïdes. De la même façon, on a mis en évidence, pour ces membranes, une exceptionnelle richesse en **glycolipides**, responsable d'une grande fluidité ; l'isolement et la caractérisation des photosystèmes (voir plus loin) ont aussi été obtenus par ces techniques.

2. RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LA RESPIRATION CELLULAIRE

2.1. Oxydation complète de l'acide pyruvique issu de la glycolyse

En dégradant le glucose en pyruvate, la glycolyse ne prélève qu'une toute petite partie de l'énergie potentielle contenue dans le substrat initial. En anaérobiose, les cellules réalisant les diverses fermentations déjà décrites doivent se contenter pour vivre de maigres bilans énergétiques (voir chapitre 7). L'acide pyruvique contient encore, sous la forme de ses liaisons intramoléculaires, beaucoup d'énergie libre qu'une oxydation complète en CO_2 et H_2O, grâce à l'oxygène de l'air (O_2), va permettre d'extraire. Au cours du processus général appelé **respiration cellulaire**, un maximum de l'énergie dégagée par la réaction suivante pourra donc être récupéré :

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$
$$(\Delta G°' = -2\ 873\ kJ.mol^{-1})$$

Le rôle physiologique des mitochondries dans cette opération est primordial au sein des cellules eucaryotiques : elles permettent l'oxydation complète des métabolites et sont ainsi les principales pourvoyeuses de l'énergie chimique consommée dans tous les processus vitaux. Nous verrons plus loin qu'elles interviennent aussi dans le métabolisme général de la cellule, en participant à de nombreuses synthèses ou dégradations chimiques (acides aminés, lipides…).

Les phénomènes respiratoires prenant la suite de la glycolyse impliquent trois séries d'événements biochimiques ayant lieu au sein de ces organites :

- la dégradation complète du pyruvate (CH_3 CO COOH) en CO_2 et [H_2], ce dernier étant pris en charge par des coenzymes qui passent de l'état oxydé à l'état réduit ; ceci se réalise au cours d'un cycle de réactions, appelé **cycle de Krebs**, qui se déroule pour l'essentiel dans la matrice ;
- la **réoxydation des coenzymes** et le **transport des électrons** (e) qu'ils ont cédés, le long d'une chaîne de transporteurs situés dans la membrane interne, jusqu'à un accepteur final : l'oxygène. C'est l'étape de formation de l'eau produite par la respiration. Au cours de ce transport, une expulsion de protons a lieu, créant de part et d'autre de la membrane mise en jeu une différence de concentration et de pH ;
- la **fabrication** proprement dite **de l'ATP**, par phosphorylation de l'ADP, a lieu lorsque les protons franchissent à nouveau la membrane interne dans le sens du gradient précédemment formé, au niveau de canaux particuliers (ATP synthétases). C'est à ce moment là seulement que l'essentiel de l'énergie libre contenue dans le glucose initial est transformée en énergie chimique. La molécule d'ATP est présentée dans la figure 10.8.

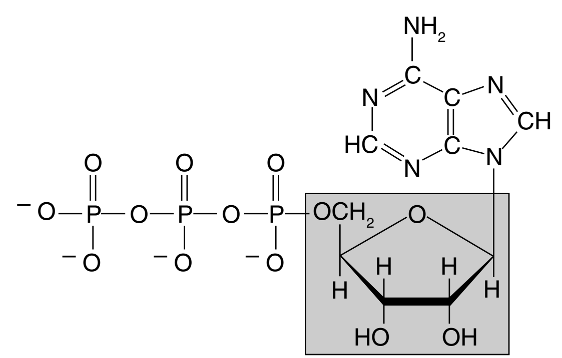


Figure 10.8

Formule de la molécule d'ATP

Le dernier groupement phosphate est très aisément libéré de la molécule par hydrolyse et transféré (au cours de réactions couplées) à d'autres composés qui sont alors activés. La liaison covalente qui est rompue, parfois qualifiée de «liaison riche», n'a rien de particulier en soi.

Ces deux dernières étapes constituent ce qu'on appelle la **phosphorylation oxydative**. Une différence importante existe entre ce mode de synthèse de l'ATP et celui mis en jeu dans la glycolyse : il s'agit de la nécessité absolue d'une structure membranaire close, d'un compartiment cellulaire permettant la réalisation d'un gradient de protons. Bien que hors de propos dans ce développement, il faut noter que des mécanismes générateurs d'énergie fondamentalement identiques se déroulent chez la plupart des Bactéries, mais ils mettent alors en jeu le hyaloplasme et la membrane plasmique de ces cellules (qui ne présentent ni compartimentation ni organites ; voir chapitre 2).

2.2. Le rôle majeur du cycle de Krebs : la formation du pouvoir réducteur

2.2.1. Devenir du pyruvate formé par la glycolyse : la formation de l'acétyl-CoA

Le pyruvate franchit aisément la membrane externe des mitochondries (par les pores déjà signalés), puis il utilise pour franchir la membrane interne une **protéine porteuse** spécifique (voir plus loin). Une fois parvenu dans la matrice, il subit une décarboxylation oxydative qui le transforme en résidu acétyl [CH_3 CO] grâce à l'intervention d'un coenzyme libre appelé coenzyme A (CoA). Ce coenzyme est associé au fonctionnement d'un complexe enzymatique soluble de grande taille : 40 nm de diamètre, 60 sous-unités et 4 500 kDa de masse moléculaire, appelé **pyruvate décarboxylase-déshydrogénase** ; il est formé de trois enzymes multimériques catalysant chacune une réaction spécifique. Globalement, la réaction est la suivante :

[CH_3 CO] COOH + Coenzyme A + NAD^+
[acétyl] CoA

$\rightarrow CO_2 + NADH + H^+ +$ [CH_3 CO]-CoA
acétyl-CoA

Le bilan de celle-ci est donc : le dégagement d'un CO_2, la réduction d'un NAD^+ en $NADH + H^+$, et la formation d'un acétyl-CoA, dans lequel la partie importante du point de vue métabolique, est le seul chaînon dicarboné [CH_3 CO] issu du pyruvate. L'acétyl-CoA est une molécule centrale, une «plaque tournante», dans le métabolisme énergétique car elle constitue un lieu de convergence de la dégradation de nombreux nutriments, en particulier des acides gras qui constituent la réserve énergétique par excellence.

2.2.2. L'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs et son oxydation

Le chaînon dicarboné acétyl est condensé avec l'**acide oxaloacétique** (diacide organique à quatre carbones), en même temps que le CoA est régénéré. Le produit formé est l'**acide citrique** (l'acide des citrons, bien connu comme additif alimentaire) qui est un acide tricarboxylique à 6 C ; l'enzyme de condensation est appelée **citrate synthétase**. Le cycle de Krebs est, en résumé, une suite de neuf réactions consistant essentiellement en une série de deux décarboxylations et de quatre déshydrogénations redonnant finalement la molécule à 4 C qui a servi d'accepteur initial, après avoir dégradé complètement le groupement [CH_3 CO] introduit dans le système. Les deux décarboxylations donnent du CO_2, qui est en fait celui dégagé par la respiration, au niveau de l'organisme ; avec celle qui a eu lieu lors de la formation de l'acétyl-CoA, on a bien perdu les 3 C de la molécule d'acide pyruvique formée par la glycolyse. En ce qui concerne les déshydrogénations, elles font intervenir deux coenzymes classiques d'oxydoréduction : le NAD^+ et le FAD (voir l'ouvrage *Biochimie 1er cycle*, de G. Hennen) ; tous passent à l'état réduit au cours des quatre réactions d'oxydation des intermédiaires du cycle (3 $NADH + H^+$; 1 $FADH_2$). Avec le NADH formé lors de la synthèse de l'acétyl-CoA, on a donc extrait cinq paires d'électrons du pyruvate initial (pour les détails, voir *figure* 10.9).

Toutes les étapes du cycle de Krebs, à l'exception d'une seule, se déroulent dans la matrice mitochondriale et mettent en jeu des substrats et des enzymes solubles. Alors que le NADH est une molécule libre dans la matrice de l'organite, le FAD est en revanche réduit en tant que coenzyme étroitement lié (groupement prosthétique covalent) à

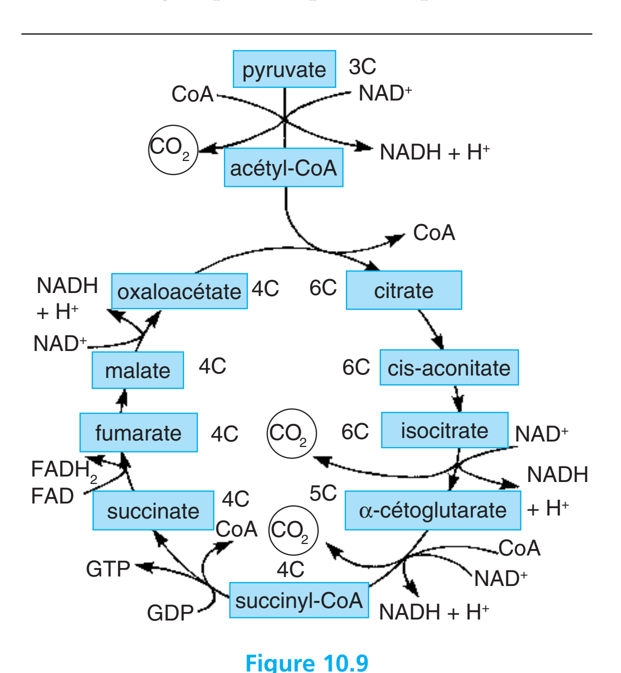


Figure 10.9
Étapes du cycle de Krebs
Noter le devenir de tous les atomes contenus dans le pyruvate provenant de la glycolyse ; la dégradation de cette molécule est complète et conduit à du CO_2 et des coenzymes réduits, ainsi qu'à une molécule de GTP.

une protéine de la membrane interne de la mitochondrie : la **succinate-déshydrogénase**. L'encart suivant décrit une technique classique de cytoenzymologie permettant de visualiser simplement l'activité de cette enzyme.

ENCART TECHNIQUE

Mise en évidence de l'activité succinate-déshydrogénase dans les mitochondries de cellules vivantes

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :

succinate + coenzyme oxydé (FAD) → fumarate + coenzyme réduit ($FADH_2$)

Aucune des molécules produites dans ce système ne remplit les conditions requises dans la technique cytoenzymologique, relativement à la couleur et l'insolubilité (voir chapitre 3). On couple donc cette réaction à une autre, non biologique et spontanée, mettant en jeu un composé qui est soluble et de couleur jaune pâle à l'état oxydé, et insoluble et formant un précipité de couleur bleu-violacé à l'état réduit (nitrobleu de tétrazolium). On a donc la réaction :

$FADH_2$ + composé oxydé jaune → FAD + composé réduit bleu-violacé

Le produit final des deux réactions couplées s'accumule donc sur le lieu de la réaction catalysée par la succinate-déshydrogénase, c'est-à-dire au sein des mitochondries.

Expérimentalement, on choisit des cellules vivantes qui se prêtent à ce genre d'études : cellules isolées (Protistes), épithéliums animaux ou végétaux, tissus faciles à écraser et dans lesquels les organites sont faciles à voir. Celles-ci sont incubées dans une solution tamponnée de succinate de Na et de sel de tétrazolium oxydé à faibles concentrations (pour éviter la toxicité). Une coloration violette apparaît au niveau de structures cellulaires visibles au microscope et qui sont les mitochondries. Cette réaction se réalise aussi *in vitro*, sur des fractions purifiées de ces organites. Divers contrôles sont nécessaires pour démontrer que seule cette réaction est mise en évidence, en particulier l'utilisation d'un inhibiteur compétitif très spécifique de l'enzyme : le malonate (de structure très proche de celle du succinate). Cette coloration vitale conduit néanmoins à terme à la mort de la cellule en raison de l'accumulation irréversible du composé réduit dans les mitochondries.

Du point de vue énergétique, le cycle de Krebs est directement à l'origine d'une seule molécule riche en énergie par tour : une molécule de GTP, équivalente à un ATP. Celle-ci est formée par une décarboxylation oxydative mettant en jeu le CoA, et qui est une réaction très voisine dans son mécanisme de celle qui conduit à la formation de l'acétyl-CoA. On doit donc retenir que le cycle de Krebs n'est pas principalement en soi un système générateur d'énergie, mais un système fournissant des coenzymes réduits qui, eux, seront réoxydés et à l'origine d'une synthèse ultérieure abondante d'ATP. L'énergie libre, contenue initialement dans le glucose et récupérée lors des réactions d'oxydoréduction successives, est donc ainsi provisoirement stockée sous la forme de ce qu'on appelle habituellement le **pouvoir réducteur**, constitué par NADH + H^+ et $FADH_2$.

Du point de vue métabolique, on note que le cycle de Krebs met en jeu des acides organiques comportant successivement six, cinq et quatre carbones. Nous avons déjà annoncé que certains d'entre eux servent aussi de relais avec le métabolisme dégradatif des aliments autres que les sucres, ou avec le métabolisme de synthèse de nombreux précurseurs (voir chapitre 7). Il faut bien comprendre que : 1) ce cycle n'est pas isolé abstraitement dans la mitochondrie, comme on le fait sur les schémas, 2) chaque tour de cycle commencé au niveau du citrate ne se termine pas forcément, et 3) on peut, en contrepartie, entrer dans le cycle à différents niveaux autres que le citrate. Nous étudierons ceci dans un développement réservé à l'analyse de l'intégration du métabolisme.

2.3. Transport des électrons le long de la chaîne des transporteurs membranaires (chaîne respiratoire)

2.3.1. Notion de chaîne de transporteurs

Les transporteurs réduits au cours du cycle de Krebs cèdent leurs électrons à l'O_2 à la fin d'une longue cascade de réactions d'oxydoréduction mettant en jeu des constituants de la membrane mitochondriale interne. Celle-ci est très riche en protéines, parmi lesquelles on compte de nombreuses déshydrogénases ou transporteurs d'électrons à groupements prosthétiques divers : **déshydrogénases flavoprotéiques** (à FAD ou FMN), **cytochromes** variés (protéines à hème) et

protéines à centres «fer-soufre» (Fe/S). L'étude des potentiels d'oxydoréduction des couples Red./Ox. constitués par ces molécules montre qu'ils peuvent être classés, en fonction de leur E°', dans un ordre tel que le flux des électrons est théoriquement spontané depuis les coenzymes réduits initiaux jusqu'à l'O_2, pour former finalement H_2O, avec l'aide des protons (voir plus loin). Le constituant ayant le plus haut potentiel oxyde celui qui a le plus bas potentiel ; c'est l'inverse si on parle de réduction. Outre ces protéines, des petites molécules organiques simples, hydrophobes et incluses dans la bicouche lipidique, servent de **transporteurs mobiles d'hydrogène** entre les complexes que l'on vient de citer (par exemple : le **coenzyme Q**).

Le principe d'une telle cascade d'oxydoréduction, semblable à ce que l'on trouvera aussi dans la photosynthèse, est schématiquement représenté dans la *figure* 10.10, où les composés P1, P2, Pn, représentent des transporteurs d'hydrogène ou d'électrons qui peuvent être de natures très diverses. Il faut cependant bien comprendre que le transfert ordonné et non anarchique (c'est-à-dire sans «courts-circuits») des électrons le long d'une telle cascade est dû à la spécificité des interactions qui s'établissent entre un nombre limité de gros complexes protéiques constituant la chaîne d'oxydoréduction mitochondriale. La différence de potentiel standard d'oxydoréduction entre les deux couples extrêmes de cette chaîne est de 1,14 volt, ce qui représente une libération d'énergie libre considérable : $\Delta G°' = -$ 218 $kJ.mol^{-1}$, pour deux électrons transférés du NADH à O_2.

2.3.2. Organisation moléculaire et fonctionnement de la chaîne respiratoire

Son organisation a été longtemps méconnue car les protéines membranaires, hydrophobes et insolubles dans les tampons d'extraction aqueux habituels, sont de façon générale difficiles à purifier sous forme de complexes intacts et fonctionnels (voir chapitre 5). L'utilisation de détergents doux (le désoxycholate, par exemple), au début des années 60, a permis de solubiliser dans leur forme native les principaux composants de la chaîne respiratoire. Il s'agit de trois gros ensembles transmembranaires (notés I, III et IV) constitués de nombreuses chaînes polypeptidiques associées à leurs coenzymes, représentant au total au moins une quinzaine de transporteurs d'électrons ou d'hydrogène (voir *figure* 10.11) :

Figure 10.10

Transport de l'hydrogène et des électrons dans la chaîne respiratoire.

(a) principe de la cascade des transporteurs P_1, P_2, P_n ordonnés, selon leurs potentiels d'oxydoréduction, entre les couples extrêmes $NAD^+/NADH + H^+$ (E°' = – 0,32 volt) et $H_2 + 1/2\ O_2/H_2O$ (E°' = + 0,82 volt) ; le flux des électrons est spontané tout le long de cette chaîne théorique (réactions exergoniques) ; **(b)** schéma illustrant la séparation des transports des électrons et des protons dans la chaîne respiratoire mitochondriale.
Le mouvement des électrons s'effectue spontanément depuis les potentiels les plus négatifs vers les potentiels les plus positifs.

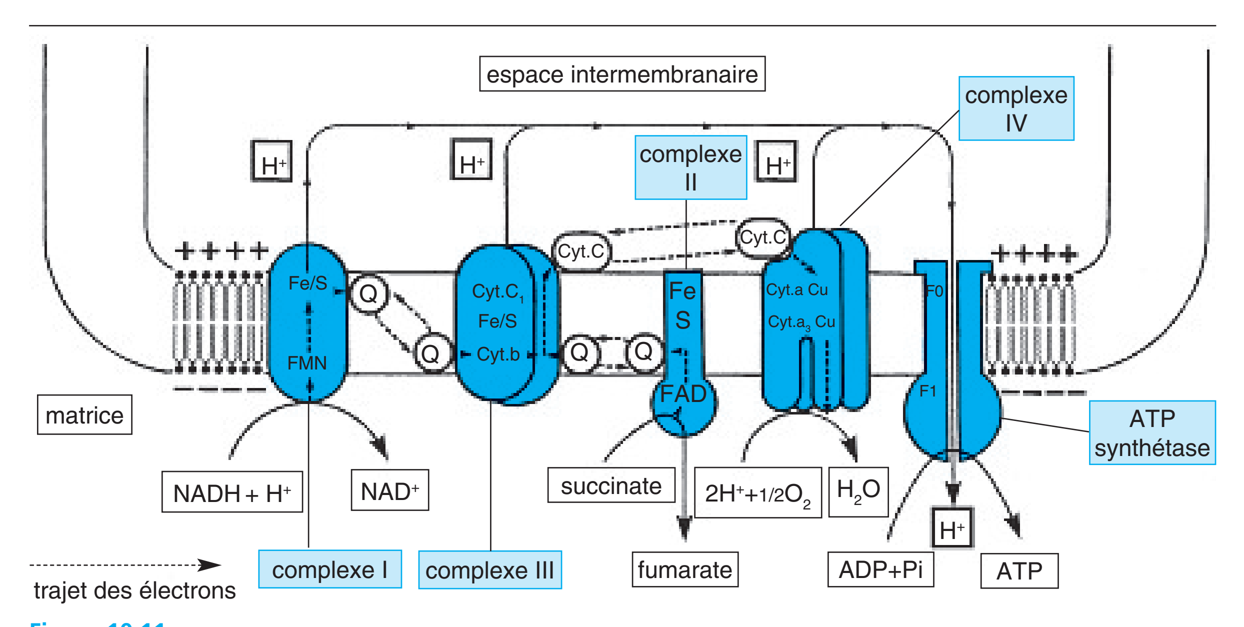


Figure 10.11

Organisation de la membrane mitochondriale interne

Les trois gros complexes d'oxydoréduction protéiques notés I, III et IV, chassent les protons vers l'espace intermembranaire et participent à la création du gradient de protons qui est exploité par l'ATP synthétase pour fabriquer de l'ATP. Deux transporteurs mobiles sont impliqués : le coenzyme Q (qui diffuse dans la bicouche) et le cytochrome c, situé dans l'espace intermembranaire. La succinate-déshydrogénase est également représentée (complexe II).

– le complexe **NADH déshydrogénase** : c'est un gros monomère (850 kDa), contenant 26 polypeptides parmi lesquels une protéine à FMN et des protéines à centre Fe/S. Son rôle est d'oxyder le NADH et de transférer ses électrons au coenzyme Q intramembranaire (CoQ, ou ubiquinone) ;

– le complexe des **cytochromes b/c1** : c'est un dimère (550 kDa), contenant dix polypeptides, parmi lesquels les cytochromes b, c1 et une protéine à centre Fe/S. Son rôle est d'oxyder le CoQ et de transférer les électrons au cytochrome c (**cytochrome mobile** situé en périphérie de la membrane interne, du côté externe) ;

– le complexe de la **cytochrome oxydase** (a.a3) : c'est un dimère (320 kDa), contenant neuf polypeptides, parmi lesquels les deux cytochromes a et a3, ainsi que des protéines à cuivre. Son rôle est d'accepter les électrons du **cytochrome c** (cyt.c) et de les céder à l'accepteur final, l'O_2. Les cytochromes de la classe **a** sont les seuls qui soient **auto-oxydables**, c'est-à-dire capables de s'oxyder spontanément au contact de O_2.

Ces trois complexes ne constituent pas, au sein de la membrane interne, une chaîne structuralement organisée car ils y sont présents en effet en quantités bien différentes les unes des autres. Dans les mitochondries de cœur, par exemple, on mesure les proportions respectives suivantes pour les trois complexes : 1, 3 et 7, ainsi que 9 molécules de cyt.c et 50 molécules de CoQ. Les transporteurs mobiles d'électrons et d'hydrogène (cyt.c et CoQ) diffusent en fait rapidement dans le plan de la membrane (soit à la surface, soit dans son épaisseur) et rencontrent aléatoirement les gros complexes protéiques avec lesquels ils interagissent, après les avoir reconnus grâce à une relation spécifique de type enzyme/substrat. Certaines des sous-unités polypeptidiques de ces trois complexes sont codées par le génome mitochondrial ; chez les Animaux, par exemple, on en compte respectivement 7, 1 et 3, dont on peut identifier les gènes sur la *figure* 4.18.

L'analyse des mécanismes de transport mis en jeu le long de cette chaîne montre qu'il existe, parmi les échangeurs d'hydrogène, des transporteurs d'hydrogène moléculaire et des transporteurs d'électrons seuls. La chaîne respiratoire commence en fait par un événement unique qui est la séparation du pouvoir réducteur en protons et électrons ($H = H^+ + 1$ e) puisque le NADH, qui est un transporteur mixte d'ions hydrure (H + 1 e) ne cède que des électrons au premier complexe (la NADH

déshydrogénase, contenant des protéines à centres Fe/S, qui n'acceptent eux-mêmes que des électrons). Le sort des protons ainsi libérés et exclus du transport sera évoqué plus loin. L'intervention ultérieure du CoQ fait à nouveau appel à des protons (prélevés dans la matrice) qui s'associent à son niveau aux électrons transférés le long de la chaîne ; on rappelle que ce coenzyme est un transporteur d'hydrogène alors que les cytochromes sont exclusivement des transporteurs d'électrons. En fin de chaîne, les électrons servent à activer l'oxygène moléculaire qui, en présence des protons, séparés dès le début de l'opération, donnera l'eau (déchet du métabolisme respiratoire), selon la réaction globale présentée dans la *figure* 10.10.

Comme le NADH est une molécule très réductrice, les électrons qui entrent dans cette chaîne d'oxydoréductions ont une très haute énergie et ils la perdent progressivement au cours de leurs différents échanges. Le fractionnement de cette réaction globale de mise en commun de H_2 et O pour former H_2O évite que toute l'énergie soit inutilement transformée en chaleur (comme en chimie minérale) et permet son stockage sous une forme exploitée ultérieurement pour fabriquer de l'ATP. Il existe trois étapes susceptibles de «dégager» de l'énergie libre en quantité significative, car le $\Delta E'°$ entre les complexes Red./Ox. concernés correspond à un **saut énergétique** important. Le calcul de la variation d'énergie libre (dans les conditions standard) fournit les résultats suivants :

NADH → CoQ : $\Delta E°' = 0{,}27$ volt
($\Delta G°' = -51$ kJ.mol^{-1})

CoQ/cyt.b → cyt.c : $\Delta E°' = 0{,}22$ volt
($\Delta G°' = -41{,}4$ kJ.mol^{-1})

cyt.c/cyt.a.a3 → O_2 : $\Delta E°' = 0{,}53$ volt
($\Delta G°' = -99{,}5$ kJ.mol^{-1})

Ces trois étapes correspondent en fait au fonctionnement des trois complexes précédemment signalés, qui se comportent comme des **dispositifs de conversion énergétique**, grâce à un mécanisme original de couplage énergétique que nous analyserons plus loin. Chacun de ces trois sauts énergétiques est théoriquement susceptible de permettre la phosphorylation de l'ADP + Pi en ATP puisqu'on sait que le $\Delta G°'$ d'hydrolyse de cette molécule est de $-30{,}5$ kJ.mol^{-1} (le $\Delta G°'$ de la réaction inverse de synthèse étant donc de $+30{,}5$ kJ.mol^{-1}).

La **succinate-déshydrogénase** constitue un quatrième complexe membranaire (130 kDa), qui est tourné vers l'intérieur de la membrane et a ainsi aisément accès aux substrats matriciels. La réoxydation du $FADH_2$ fourni par la réaction qu'il catalyse se fait directement sur le CoQ, qui se réoxyde par la voie habituelle. On note que, dans ce cas, le premier des trois sauts énergétiques décrits plus haut est court-circuité, de sorte que la récupération de l'énergie à partir de ce substrat réduit est inférieure à celle que permet l'utilisation du NADH (2 ATP au lieu de 3). La dernière question reste donc de savoir comment cette énergie potentielle est récupérée par la mitochondrie et comment elle est finalement transformée en ATP.

2.4. Création d'un gradient transmembranaire de protons. Son exploitation grâce à l'ATP synthétase

Lors de la circulation des électrons à travers les trois complexes transmembranaires analysés plus haut, l'énergie dissipée est en fait utilisée pour assurer, au niveau de chacun d'eux, un **pompage de protons** à partir de la matrice et leur expulsion dans l'espace intermembranaire. L'importante énergie libre dégagée au cours des échanges d'électrons évoqués précédemment est nécessaire pour permettre le transfert des protons contre leur gradient de concentration, ce qui est évidemment un phénomène non spontané et consommateur d'énergie. L'asymétrie de la membrane interne est donc une nécessité absolue pour la réalisation d'un processus qui est fondamentalement vectoriel. Ce phénomène de pompage est directement mis en évidence grâce à la réalisation de protéoliposomes dans la membrane desquels chaque complexe purifié est intégré (voir chapitre 5). Lorsqu'un donneur et un accepteur d'électrons appropriés sont fournis à ces systèmes reconstitués, on démontre l'existence d'un transfert de protons à travers la membrane. Le mécanisme intime par lequel le transport des électrons est couplé au pompage des H^+ est encore mal connu et sans doute différent pour les trois complexes respiratoires.

Le résultat du fonctionnement de la chaîne respiratoire est la réalisation d'un **gradient de concentration de protons** de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne : il y a déficit en H^+ dans la matrice (pH basique) et excès dans l'espace intermembranaire (pH acide) (voir *figure* 10.11). Ceci s'accompagne d'une différence de charge électrique puisque la face intérieure de

la membrane devient négative et sa face extérieure devient positive. On a en fait un double gradient de charges et de protons, dit **gradient électrochimique**, qui exerce ce qu'on appelle une **force proton-motrice**. On estime que le gradient de pH correspond à 1 unité de pH et que le potentiel de membrane est égal à 160 mV. Il est évident que la tendance «naturelle» des protons accumulés, liée aux phénomènes de diffusion simple et aux phénomènes électriques, est de rentrer à nouveau dans la matrice, avant même qu'ils aient eu le temps de s'échapper par les pores de la membrane externe.

La membrane interne étant imperméable aux ions, le seul moyen pour les protons de réintégrer la matrice est d'emprunter les canaux constitués par les complexes transmembranaires appelés **ATP synthétases**. Ceux-ci sont constitués d'une tête sphérique : la **particule F1**, baignant dans la matrice, elle-même accrochée par une tige, ou un canal transmembranaire : la **particule F0**. La masse moléculaire de cet énorme assemblage est de 500 kDa ; il est constitué de neuf chaînes polypeptidiques différentes (dont deux sont codées par le génome mitochondrial, chez les Animaux). Ces complexes représentent à eux seuls 15 % de la masse des protéines de la membrane interne (voir *figure* 10.10). Les mécanismes couplant le passage des protons à travers le complexe ATP synthétase à la phosphorylation de l'ADP ne peuvent être développés ici ; on se contentera de dire que la tête F1 fonctionne à la manière d'une turbine mue par le flux de protons. L'ATPsynthétase ne fonctionne comme canal à protons qu'en présence d'ADP, qui exerce donc un contrôle strict sur toute la chaîne de transport des électrons (saturation du gradient de protons en l'absence d'ADP).

Les ATP synthétases sont des sytèmes réversibles, en ce sens que l'on a montré qu'elles peuvent expulser activement des protons à travers la membrane, dans la direction opposée à celle vue précédemment, et contre un gradient de concentration. Dans ces conditions, le processus consomme de l'énergie au lieu d'en fournir ; celle-ci est fournie par une hydrolyse de l'ATP, ayant lieu au sein de la tête F1. On peut en outre annoncer que dans les chloroplastes (au niveau des sacs thylakoïdiens), ainsi que chez les Bactéries (au niveau de la membrane plasmique), des systèmes analogues à celui-ci fonctionnent de la même façon, soit pour synthétiser de l'ATP, chez les premiers, soit afin de créer des gradients de protons utilisables pour d'autres fonctions (que nous verrons plus loin) par

ENCART TECHNIQUE

Démonstration du rôle des ATP synthétases

Le rôle de ces complexes dans la synthèse de l'ATP a été démontré, dès les années 60, de la façon suivante : il est possible d'obtenir (par dissociation aux ultrasons de mitochondries purifiées) des vésicules correspondant à des lambeaux de la membrane interne refermés sur eux-mêmes. Ces vésicules ont toutes la même polarité et les têtes des ATP synthétases sont tournées vers l'extérieur, comme le montre la microscopie électronique. *In vitro,* ces structures assurent le transport des électrons du NADH à l'oxygène, tout en couplant cette oxydation à la synthèse d'ATP (phosphorylation oxydative). Au moyen de détergents appropriés, on peut décrocher les têtes F1 et les solubiliser ; les vésicules ainsi dénudées assurent encore l'oxydation de NADH, mais pas la synthèse d'ATP. Par ailleurs, les têtes F1 récupérées seules ont la capacité d'hydrolyser l'ATP (activité ATP asique) mais pas de le synthétiser. Si l'on rassemble à nouveau les deux composants (F0 + F1), des vésicules complètes se reconstituent et retrouvent toutes leurs propriétés !

La preuve du rôle du gradient de protons dans la phosphorylation fut apportée par l'expérience suivante : si l'on charge en protons (grâce à un protocole qu'on ne détaillera pas ici) le contenu des vésicules submitochondriales, et qu'on les transfère ensuite dans un milieu dont le pH est supérieur au pH interne (déficit relatif en H^+) on obtient instantanément, sans intervention de processus d'oxydation (car on ne fournit ni NADH ni O_2), une phosphorylation fugace de ADP + Pi en ATP. C'est en se basant sur de telles expériences que P. MITCHELL, dès 1961, a proposé son hypothèse, nommée **théorie chimiosmotique**, pour rendre compte de la phosphorylation oxydative. Cette hypothèse, dans laquelle sont associés des phénomènes chimiques et des phénomènes osmotiques (transport ionique), prévoyait un mécanisme de synthèse de l'ATP complètement différent de celui qui avait été décrit pour la glycolyse (phosphorylation au niveau du substrat) et nécessitant une structure close, limitée par une membrane imperméable aux protons, afin qu'un gradient puisse être créé et exploité.

fonctionnement inversé, chez les secondes. Il semble donc clair que ce mécanisme universel de fabrication de l'ATP soit, tout comme la glycolyse, évolutivement très ancien.

On retiendra, en conclusion, qu'une grande partie de l'énergie libre utilisable contenue dans le glucose, et libérée par oxydation complète grâce à l'oxygène, se trouve en fin de compte transformée en un gradient électrochimique dans la mitochondrie, après avoir été momentanément stocké sous forme de pouvoir réducteur.

2.5. Bilan de l'oxydation complète d'une molécule de glucose

En prenant en compte tout le pouvoir réducteur produit au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs, et sachant que chaque molécule de NADH réoxydé conduit théoriquement à la synthèse de trois molécules d'ATP (trois sauts énergétiques suffisants dans la cascade des potentiels) et que chaque molécule de $FADH_2$ permet seulement la synthèse de deux ATP, on calcule que 38 ATP sont synthétisés, au maximum, par molécule de glucose. Sachant qu'un ATP représente une énergie libre de 30,5 kJ.mol^{-1}, on calcule que 1 160 kJ.mol^{-1} utilisables ont été extraits à partir des 2 873 potentiellement contenus dans une mole de glucose ; ceci représente un **rendement théorique de conversion** de 38 %. Cette valeur est de loin très supérieure à ce que permettent les meilleures machines thermiques ou électriques construites par l'Homme (10 à 20 %). La raison de cette remarquable efficacité des machines biologiques tient au fractionnement du processus de combustion des aliments en multiples étapes, nécessitant plusieurs intermédiaires, mais dégageant chacune de petites quantités d'énergie utilisable.

L'encart biomédical suivant traite d'un sujet de société particulièrement «brûlant».

3. RÔLE DES CHLOROPLASTES DANS LA PHOTOSYNTHÈSE

La quasi-totalité de l'énergie libre consommée par les êtres vivants provient de l'énergie solaire captée par les Végétaux à travers la photosyn-

ENCART BIOMÉDICAL

Sport, métabolisme oxydatif et aide ergogénique à la performance

Les physiologistes du sport sont très sollicités pour tester de nouvelles méthodes d'entraînement et des molécules déjà connues, voire élaborées dans le seul but d'améliorer les performances des athlètes. L'ensemble de ces procédés est pudiquement baptisé «aide ergogénique à la performance». On peut citer quelques exemples de molécules utilisées :

- agents pharmacologiques : amphétamines, bêtabloquants, diurétiques,
- hormones : hormone de croissance, stéroïdes anabolisants,
- agents «oxygénants» : érythropoïétine, transfusions,
- additifs nutritionnels : glucides, vitamines, créatine.

Un muscle se contractant vigoureusement consomme 100 fois plus d'ATP qu'au repos ; l'apport accru en métabolites et en oxygène est donc une exigence capitale pour un effort continu. L'utilisation d'hormones anabolisantes conduit à la fois à une augmentation de la masse et de la puissance musculaires (en accroissant le nombre, la taille et les capacités métaboliques des fibres musculaires), et à celle des capacités respiratoires ou circulatoires de l'organisme.

Les effets de l'hormone de croissance sont les suivants : 1) stimulation de la synthèse des protéines dans les fibres musculaires, 2) stimulation de la production des acides gras, qui sont le nutriment privilégié de ces cellules lors d'efforts prolongés, et 3) augmentation de la concentration sanguine en glucose. Les stéroïdes anabolisants, dérivés de la testostérone, sont recherchés dans les sports qui exigent masse musculaire importante et force (lancer de poids, haltérophilie). Les sports tels que la course, où l'endurance est primordiale, sont en revanche peu concernés par ces substances dopantes.

D'autres agents augmentent l'apport en oxygène et améliorent le métabolisme aérobie des fibres musculaires. A côté des autotransfusions de sang «fabriqué en altitude», il est possible d'utiliser les effets de l'érythropoïétine. Synthétisée par les reins, cette hormone stimule fortement la production des hématies. La fabrication de toutes ces hormones illicites, banalisée par le génie génétique, les rend aisément accessibles.

thèse : organismes **autotrophes**, ils sont des producteurs primaires, et se situent ainsi à la base de toutes les chaînes trophiques (voir chapitre 1). La moitié de l'activité photosynthétique sur la planète est assurée par des micro-organismes (Procaryotes ou Eucaryotes) vivant dans les océans : le phytoplancton. Seuls quelques rares écosystèmes indépendants de la lumière, à base de chimiosynthèses, existent, en particulier dans les grands fonds sous-marins, au niveau des dorsales océaniques.

3.1. Découverte du processus fondamental

L'équation de base de la photosynthèse est donnée par la simple formule suivante, où $C(H_2O)$ représente un «élément de glucide», car le glucose peut en effet s'écrire : $(CH_2O)_6$:

$$H_2O + CO_2 \rightarrow C(H_2O) + O_2$$

Les premiers travaux sur la photosynthèse datent de plus de 200 ans ; une étape importante dans la compréhension de ses mécanismes biochimiques fut accomplie grâce à Hill, en 1939. Cet auteur montra le rôle de la lumière dans le transport des électrons et ouvrit ainsi la voie aux recherches modernes dans ce domaine. Il prouva que des chloroplastes isolés assurent un dégagement d'O_2 s'ils sont éclairés en présence d'un accepteur convenable d'électrons, comme le ferricyanure (réduit en ferrocyanure) ou des colorants organiques ; de tels composés sont nommés **réactifs de Hill**. Cette expérience simple est très importante car : 1) elle prouve que l'O_2 dégagé vient de l'eau, car il n'y a pas besoin de CO_2 dans le phénomène ; c'est la **photolyse de l'eau** ; 2) elle montre que les réactions liées à la lumière peuvent être découplées de la réduction du CO_2, car il n'y a pas formation de sucres, dans ce cas ; 3) elle révèle que les chloroplastes peuvent transformer l'énergie de la lumière et la transférer à des composés organiques sous forme de pouvoir réducteur. Ceci se fait contre un fort gradient de potentiel chimique car O_2 est le plus puissant accepteur d'hydrogène ou d'électrons connu. Il faut bien comprendre que le mouvement des électrons dans le cas de la photosynthèse est endergonique puisqu'il est opposé à celui présenté pour les oxydations respiratoires, qui a été décrit comme spontané et exergonique.

L'équation générale de la photosynthèse peut donc se simplifier, dans un premier temps, en mettant en évidence l'origine et le devenir des électrons, de la façon suivante :

$$H_2O + A \xrightarrow[\text{lumière}]{} AH_2 + 1/2\,O_2$$

Dans cette réaction, A est un accepteur d'électrons et AH_2 est sa forme réduite. La réaction de Hill est une simple étape initiale : l'accepteur terminal des électrons excités par la lumière absorbée est, bien sûr, le CO_2, et il faut imaginer que les chloroplastes contiennent des transporteurs capables d'acheminer les électrons depuis l'eau jusqu'au CO_2. Il fut montré en 1951 que le $NADP^+$ était capable de se réduire, dans les mêmes conditions qu'un réactif de Hill, en association avec la production d'O_2. Le NADPH, tout comme le NADH ($E°' = -0{,}32$ volts), est un puissant réducteur capable de céder ses électrons à de nombreux substrats et de les réduire. La photosynthèse consiste donc globalement en une «lyse» de l'eau, et l'O_2 dégagé est en fait un déchet de ce métabolisme.

3.2. Les mécanismes fondamentaux de la photosynthèse

L'effet primaire de la lumière est donc de faire fonctionner une chaîne de transporteurs d'électrons spécifique : la **chaîne photosynthétique**, qui est à l'origine à la fois de l'énergie chimique (ATP) et du pouvoir réducteur ($NADPH + H^+$). La question reste de savoir comment, tout au début du processus, on peut inverser le flux naturel des électrons qui iraient spontanément du NADPH à l'oxygène, c'est-à-dire d'un couple Red./Ox. à $E°' < 0$ à un couple à $E°' > 0$.

3.2.1. Réactions «lumineuses» et «obscures»

Le processus photosynthétique repose sur des mécanismes complexes au sein desquels on distingue classiquement deux phases principales :

– celle directement liée à la capture de l'énergie lumineuse puis à sa transformation en énergie et en substrats chimiques (ATP et NADPH). Cette phase, purement chloroplastique, est appelée **phase lumineuse** (ou claire) : ce sont des réactions dans lesquelles un électron activé par la lumière solaire quitte la chlorophylle et se déplace le long d'une chaîne d'oxydation banale ;
– celle consistant à fixer le CO_2 et à le réduire grâce aux composés précédents, pour en faire de la matière organique. Ces phénomènes ne nécessitent pas la présence de la lumière et constituent

la **phase obscure** (ou sombre), qui commence dans le stroma de l'organite mais se poursuit dans le hyaloplasme de la cellule.

Mis à part le phénomène original de la photolyse de l'eau, les mécanismes de base de la photosynthèse sont très voisins de ceux décrits dans les mitochondries (pour la phase n° 1 : transport d'électrons et genèse d'un gradient de protons transmembranaire exploité par une ATP synthétase), ou dans le hyaloplasme (pour la phase n° 2 : le cycle dit «de Calvin-Benson», qui est comparable à de nombreux égards à la voie des hexoses-monophosphates ; voir chapitre 7).

3.2.2. Les pigments photosynthétiques et leurs propriétés

La première étape de la photosynthèse est la capture de l'énergie lumineuse grâce à des pigments colorés. Ces molécules sont des photorécepteurs très efficaces car elles contiennent toutes un réseau continu de simples et doubles liaisons alternées (conjuguées) dans leur formule. Toutes les cellules photosynthétiques possèdent un ou plusieurs de ces pigments ; il s'agit des **pigments chlorophylliens** (verts), des **caroténoïdes** (jaunes, rouges, pourpres) et des **phycobilines** (bleues ou rouges) (voir un ouvrage de Biochimie).

• Les chloroplastes des Végétaux verts contiennent deux **chlorophylles** chimiquement très voisines : **a** et **b**. Toutes deux sont des molécules à noyau tétrapyrrole plan fermé (**porphyrine**), complexant un atome de Mg^{2+}. Ces deux pigments sont caractérisés par un **spectre d'absorption** spécifique de la lumière visible ; légèrement différents, ces spectres montrent chacun un pic vers 420-470 nm et un pic vers 640-700 nm. Ces molécules captent un maximum de lumière dans les couleurs rouge et bleue du spectre lumineux ; comme elles n'absorbent ni le vert ni le jaune (500 à 600 nm), elles apparaissent avec cette couleur, car seules les longueurs d'onde non absorbées traversent les tissus photosynthétiques et parviennent à nos yeux.

Les chlorophylles représentent jusqu'à 10 % de la masse des thylakoïdes. La **chlorophylle a** est toujours présente chez les organismes à **photosynthèse** dite **oxygénique** (avec production d'O_2). Elle est la plupart du temps associée à une deuxième chlorophylle : **b** chez les plantes vertes, les Algues vertes et les Euglénophycées, **c** chez les Algues brunes, les Diatomées et les Dinoflagellés ; elle est unique chez les Rhodophycées. Les **bactériochlorophylles** sont rencontrées chez les Bactéries photosynthétiques vertes et pourpres, qui réalisent une **photosynthèse non oxygénique** ; en revanche, les Cyanobactéries, qui possèdent de la chlorophylle **a**, présentent une photosynthèse oxygénique classique (voir chapitre 2).

• Les **pigments** dits **accessoires** sont représentés chez les Végétaux verts par les **caroténoïdes**, tels que le **carotène** et les **xanthophylles** (environ 2 % de la masse des thylakoïdes). Ce sont de longues molécules poly-isoprénoïdes symétriques possédant des doubles et des simples liaisons alternées ; elles sont ainsi capables de capter efficacement l'énergie lumineuse. Chez les Algues rouges et les Cyanobactéries, on rencontre les **phycobilines**, qui sont des pigments tétrapyrroliques linéaires. Comme tous les pigments photosynthétiques, ils sont associés à des protéines pour former des complexes appelés **phycobiliprotéines**.

Ces pigments sont très abondants chez certains organismes, au point de cacher les chlorophylles ; ils participent activement à la capture de la lumière, comme le montrent les spectres d'action (voir plus loin). Dans tous les cas, ils doivent cependant transférer leur énergie d'excitation à une molécule finale de chlorophylle pour que la photosynthèse ait lieu. Leur rôle physiologique consiste à élargir la gamme des longueurs d'ondes utilisables de la lumière, puisque leurs pics d'absorption diffèrent de ceux des chlorophylles et les complètent. Ceci est particulièrement vrai chez les Algues qui présentent une grande diversité de pigments, ce qui leur permet de coloniser des biotopes variés ; l'intensité lumineuse et la qualité spectrale de la lumière varient en effet en fonction de la hauteur de la colonne d'eau traversée par celle-ci. Les Algues vertes restent confinées en surface, puis les Algues brunes s'installent, et plus profondément encore les Algues rouges, qui sont susceptibles de capter, grâce à leurs phycobilines, les longueurs d'ondes médianes (500 à 600 nm) qui pénètrent le plus profondément dans la mer.

3.2.3. L'excitation des pigments par la lumière

Une façon directe de montrer le rôle des pigments dans la photosynthèse est de réaliser un **spectre d'action photochimique** : ceci consiste à mesurer l'intensité du processus (à travers l'intensité du dégagement d'O_2, par exemple) pour chaque longueur d'onde du spectre du visible. On

montre ainsi que toutes les longueurs d'onde n'ont pas la même efficacité, mais on constate surtout que la forme de la courbe obtenue se superpose presque exactement au spectre d'absorption des pigments totaux de l'organisme considéré. Chez les Végétaux verts, deux pics principaux se dégagent dans les deux courbes, au niveau des couleurs bleues et rouges ; on note aussi un effet des caroténoïdes (qui absorbent entre 450 et 500 nm) qui se traduit par un épaulement net dans les spectres d'action et d'absorption. Ce parallélisme est également valable pour les spectres d'absorption et d'action obtenus chez les Algues brunes ou rouges ; il permet de conclure sur le rôle des chlorophylles et des pigments accessoires en tant qu'acteurs principaux de la capture de l'énergie lumineuse dans les cellules.

Le processus de conversion de l'énergie commence lorsqu'un photon excite une molécule de chlorophylle ; à cause de son énergie, ce photon déplace un électron d'une orbite atomique vers une autre, plus externe et de plus haute énergie. Cette molécule excitée est une forme instable qui a naturellement tendance à retourner à son état initial non excité de diverses manières ; on distingue trois cas :

– émission de chaleur et/ou de fluorescence ;

– transfert de l'énergie de vibration de la molécule excitée, par résonance, à une molécule voisine : chlorophylle ou caroténoïde (ceci implique une grande proximité des molécules). Dans ces deux cas l'électron excité réintègre sa position initiale sur sa molécule de départ ;

– transfert net de l'électron excité et énergétique à une molécule voisine qui sert d'accepteur ; c'est typiquement une réaction d'oxydoréduction, et donc un mécanisme très différent des précédents.

Le problème crucial rencontré dans ce processus est celui de la durée des événements : le retour de l'électron sur son orbitale initiale est très rapide (de l'ordre de 4.10^{-9} seconde !). Au sein des membranes des thylakoïdes (des chloroplastes ou des Bactéries) les pigments sont en contact très étroit les uns avec les autres et associés à des protéines qui les stabilisent, de sorte que la durée des états de transition électronique est sensiblement allongée. Dans ces conditions, les électrons excités sont susceptibles d'être capturés par un accepteur stable et l'oxydoréduction est réalisable. Dans les chloroplastes, les différents pigments photosynthétiques sont associés à des protéines membranaires et forment des complexes multiprotéiques de grande taille. Ces derniers constituent des unités photosynthétiques appelées **photosystèmes**, qui comportent essentiellement deux parties, l'une, volumineuse, qui capte la lumière : l'**antenne collectrice**, et l'autre qui assure la réaction d'échange des électrons et de conversion photochimique : le **centre réactionnel** (voir *figure* 10.12).

Au sein de l'antenne, les photons sont collectés par des centaines de molécules de chlorophylle canalisant leur énergie d'activation en quelques points où se fait la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique (centres réactionnels). Les chlorophylles ne sont pas les seuls pigments intervenant dans la collecte : les pigments accessoires sont aussi sollicités, grâce aux transferts d'énergie de molécule à molécule. Les règles de ces transferts sont les suivantes : 1) les molécules doivent être très proches (1 à 7 nm) et présenter l'une par rapport à l'autre une orientation convenable, 2) des molécules de nature différente transfèrent l'énergie selon un ordre bien précis (en cascade), dicté par le fait que l'énergie émise par l'émetteur doit être supérieure à celle nécessaire au passage du récepteur de l'état normal à l'état excité.

Ces transferts ne peuvent donc s'effectuer que des pigments absorbant les plus faibles longueurs

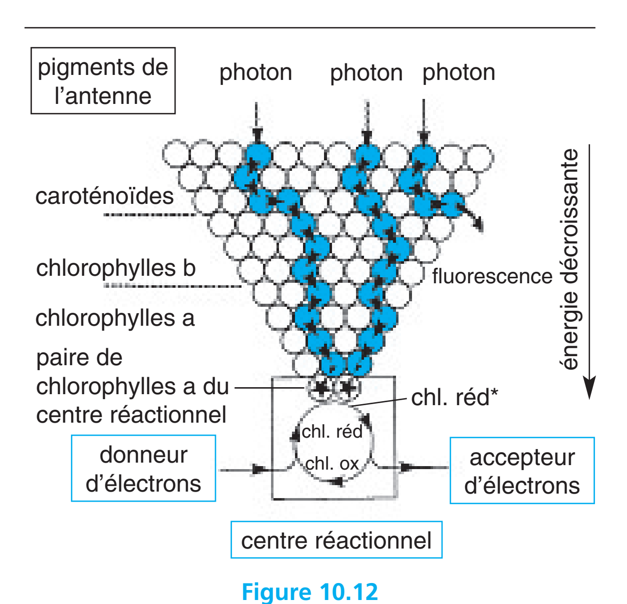


Figure 10.12

Organisation schématique d'un photosystème

L'antenne collectrice est constituée d'un grand nombre de sous-unités formées de complexes de protéines et de pigments divers, capables de capturer des photons, tandis que le centre réactionnel est formé d'un nombre réduit de complexes contenant de la chlorophylle **a**. C'est dans ce dernier qu'a lieu, par exemple, la réaction d'oxydoréduction fondamentale (photolyse de l'eau).

d'ondes (les plus énergétiques) vers les pigments absorbant les plus grandes. Après avoir analysé les pics d'absorption des différents pigments, on peut donc les ordonner en une séquence que l'on représente en forme d'«entonnoir», pour symboliser ce processus de canalisation (cette figuration n'a rien à voir, en général, avec l'organisation moléculaire de l'antenne !). Dans tous les cas, la **chlorophylle a** se situerait en bas de l'entonnoir, à cause de son spectre d'absorption étendu vers les grandes longueurs d'ondes (700 nm) c'est-à-dire vers les faibles énergies d'excitation. Chez les Algues rouges et les Cyanobactéries, qui possèdent des phycobilines, les phycobiliprotéines sont organisées en particules cylindriques, de grande taille (> 10 nm : les **phycobilisomes**) et associées à l'extérieur de la membrane des thylakoïdes.

Dans chaque centre réactionnel, une ou deux molécules de chlorophylle **a**, chimiquement identiques aux autres molécules de l'antenne, sont dans un environnement protéique tel qu'elles seront les seules à perdre effectivement un électron de haute énergie qui sera capté par un accepteur. Il y a ainsi création d'un trou positif dans la molécule de chlorophylle, qui devra être comblé grâce à la capture d'un électron fourni par un donneur approprié. Dans ce système, la chlorophylle doit donc obligatoirement être «encadrée» par un accepteur et un donneur d'électrons. Il existe deux types de photosystèmes chez les plantes vertes : le **photosystème I** (à centre réactionnel dit P_{700}) et le **photosystème II** (dit P_{680}), qui absorbent des longueurs d'ondes spécifiques.

3.3. Les deux photosystèmes : le transfert des électrons de l'eau jusqu'au NADPH ; la genèse du pouvoir réducteur

Les photosystèmes (PS) sont des complexes multiprotéiques physiquement séparables par des traitements des membranes thylakoïdiennes au moyen de détergents doux, suivis de centrifugations en gradient de densité de saccharose. Ils font partie intégrante des membranes dans lesquelles ils sont plus ou moins enchâssés, en tant que complexes transmembranaires. Au sein de ces édifices, le rôle des protéines est de maintenir une géométrie optimale des différents pigments, afin d'assurer un transfert d'énergie maximum entre donneurs et accepteurs dans les centres réactionnels. Les deux PS des Végétaux supérieurs contiennent à la fois de la chlorophylle **a** et de la chlorophylle **b**, mais le rapport **a**/**b** est plus élevé dans le **PS I** que dans le **PS II** ; les pigments accessoires y sont en quantité variable selon les organismes. Outre les pigments et les protéines de l'antenne, un grand nombre d'autres molécules, comme les transporteurs d'électrons, que nous décrirons plus loin, entrent dans la constitution des photosystèmes. Les centres réactionnels ne contiennent qu'une ou deux molécules de **chlorophylle a** située dans un environnement unique, comme on l'a vu plus haut.

Les deux photosystèmes n'ont pas la même fonction : le PS I (P_{700}) absorbe des grandes longueurs d'onde et réduit le $NADP^+$, tandis que le PS II (absorption à 680 nm et au-dessous) prélève les électrons de l'eau et est responsable de la production d'O_2. Puisque des électrons seront finalement récupérés par le $NADP^+$, et sachant qu'ils proviennent, en dernière analyse, de l'eau, il faut expliquer le lien existant entre ces électrons et ceux que les molécules de chlorophylle sont capables de capter et de transférer sous l'action de la lumière. En fait, les deux photosystèmes interagissent et interviennent séquentiellement dans la photosynthèse.

3.3.1. Le photosystème I

À la suite du transfert d'un quantum d'énergie provenant des pigments excités de l'antenne, la chlorophylle **a** du centre réactionnel P_{700} est elle-même excitée. Celle-ci cède très rapidement un électron à un accepteur membranaire, qui est une petite protéine à centre Fe-S appelée **ferrédoxine liée**. Le potentiel d'oxydoréduction de cette protéine (– 0,6 volt) en fait un réducteur nettement plus puissant que le NADPH. Comme le potentiel de P_{700} est lui-même de + 0,4 volt, il faut fournir une grande quantité d'énergie aux électrons pour les faire passer d'un potentiel Red./Ox. de + 0,4 à – 0,6 volt, ce qui est contraire à leur «tendance naturelle», comme on l'a vu plus haut ; cette énergie est en fait fournie par la lumière. Le résultat de cette opération est la perte nette d'un électron par P_{700}, qui doit rapidement en récupérer un avant de pouvoir fonctionner à nouveau (l'origine de ces électrons sera donnée plus loin). La ferrédoxine liée réduite cède son électron à une molécule de ferrédoxine soluble oxydée, localisée dans le stroma, laquelle sera réduite à son tour et permettra, grâce à une enzyme nommée ferrédoxine/$NADP^+$ réductase, la formation de NADPH.

3.3.2. Le photosystème II

Le principe de son fonctionnement est le même que celui du PS I ; le centre P_{680} qui le caractérise est lui aussi activé par la lumière, et son potentiel Red./Ox. (+ 0,8 volt) est au même niveau que celui du couple 2 H^+ + O^{--} ↔ H_2O. La perte d'un électron de P_{680} sous l'action de la lumière permet la réduction d'un accepteur qui est une **plastoquinone** (molécule voisine du CoQ mitochondrial). Cette perte d'électrons crée donc une forme oxydante forte de P_{680} qui est capable elle-même d'oxyder l'eau, c'est-à-dire de lui arracher ses électrons (et des H^+), pour se régénérer en se réduisant. C'est la **photolyse de l'eau** : $H_2O \rightarrow 2\ H^+ + 2\ e + 1/2\ O_2$; l'enzyme catalysant la décomposition de l'eau contient un groupe d'atomes de manganèse et lie deux molécules d'eau (pour conduire au dégagement d'une molécule d'O_2), ce qui implique la mobilisation de 4 e en une seule fois.

Les deux photosystèmes fonctionnent de façon séquentielle : ils sont reliés l'un à l'autre par une série de transporteurs d'électrons permettant à la plastoquinone réduite de céder en fin de compte spontanément ses électrons au PS I qui, on l'a vu plus haut, se trouve lui-même à l'état oxydé sous l'action de la lumière. Ce flux se réalise spontanément puisque les électrons s'écoulent naturellement des E°' négatifs vers les E°' positifs. Les transporteurs mis en jeu sont, dans l'ordre : 1) une plastoquinone liée au PS II (Q) ; 2) une plastoquinone libre et mobile dans la membrane (PQ) ; 3) un gros complexe transmembranaire constitué d'une protéine à centre Fe/S, d'un cytochrome de la famille b et d'un cytochrome de la famille c (qui contrairement au cytochrome c mitochondrial est ici une protéine membranaire intrinsèque) ; 4) une protéine nommée **plastocyanine** (PC), qui est une protéine à cuivre dont le métal oscille entre deux états : Cu^{2+} et Cu^+ ; cette molécule, localisée dans la cavité des thylakoïdes, cède directement son électron au PS I oxydé et ainsi le réduit. Le trajet complet des électrons le long de la chaîne, à travers les trois complexes protéiques et les transporteurs intermédiaires, est décrit de la façon suivante :

H_2O → PS II → Q → PQ → Fe-S/cyt.b/cyt.f → PC

PC → PS I → Fdx liée → Fdx libre → **NADPH**

Le flux unidirectionnel d'électrons va globalement à contre-courant du sens «normal» car il est en fait mû par la lumière, qui agit au niveau de deux propulseurs énergétiques, ou «catapultes», qui sont constitués par les deux photosystèmes. Ce système est appelé : **transport photosynthétique d'électrons non cyclique**. Une représentation synthétique tenant compte des aspects énergétiques des phénomènes est donnée dans la *figure* 10.13 ; il s'agit du classique **schéma** dit **en Z.** L'échelle des potentiels d'oxydoréduction permet de suivre les trajets spontanés (descendants) ou non spontanés (montants) des électrons depuis l'eau jusqu'au NADPH et de comprendre comment on a pu la remonter de + 0,80 volt jusqu'à – 0,32 volt. Nous verrons plus loin qu'il existe une autre modalité de transport, caractérisée par son aspect cyclique et n'impliquant qu'un seul PS.

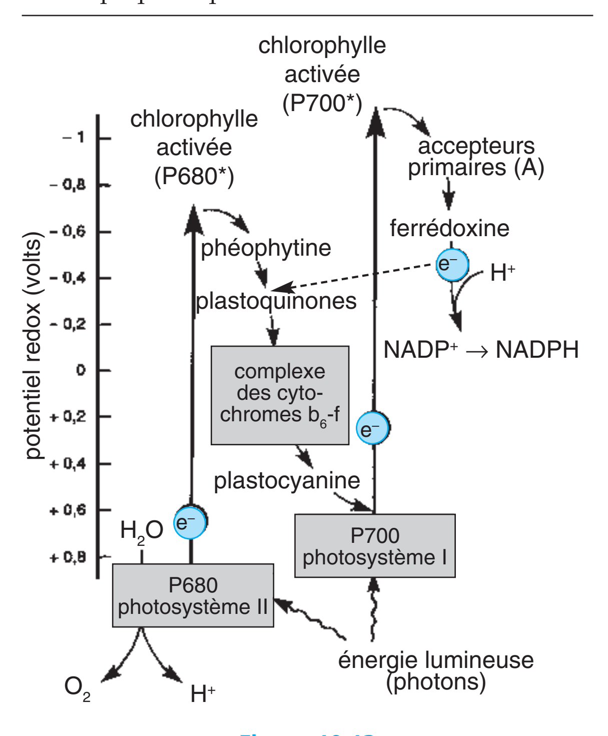


Figure 10.13

Circulation des électrons le long de la chaîne photosynthétique

Cette représentation, dite schéma «en Z», prend en compte les aspects énergétiques du transport (échelle des E°' en volts) ; elle montre bien comment l'énergie des photons, capturée par les deux photosystèmes, sert à conférer aux électrons une énergie d'activation considérable, en deux étapes successives. La photophosphorylation cyclique, qui ne produit pas de NADPH, emprunte la voie indiquée en pointillés.

3.4. Réalisation du gradient de protons et synthèse d'ATP

La chaîne photosynthétique d'électrons produit du pouvoir réducteur (NADPH), sous l'action de la lumière, mais ce n'est pas sa seule finalité. Les

chloroplastes sont capables de phosphoryler de l'ADP en ATP, en présence de Pi, sous l'effet de la lumière. Ce phénomène constitue une façon efficace de stocker l'énergie lumineuse, au même titre que ce qui se produit dans les mitochondries lorsqu'elles oxydent les substrats organiques : c'est la phosphorylation photosynthétique ou **photophosphorylation**.

Une expérience capitale pour la compréhension de ce phénomène, réalisée en 1966, montra l'importance du rôle d'un gradient transmembranaire de protons dans la synthèse de l'ATP : des chloroplastes, à l'obscurité, peuvent fabriquer de l'ATP lorsqu'une différence de pH artificielle est imposée de part et d'autre de la membrane thylakoïdienne. Cette expérience, simple dans son principe, est la suivante : on laisse incuber à l'obscurité des sacs thylakoïdiens purifiés dans un milieu tamponné à pH acide (pH 4), jusqu'à ce que le pH de leur contenu s'équilibre avec celui du milieu ; on les transfère ensuite rapidement dans un milieu à pH légèrement basique (pH 8), en même temps qu'on ajoute de l'ADP et du Pi. On constate alors qu'une brusque et brève synthèse d'ATP accompagne le rééquilibrage des pH entre sacs thylakoïdiens et milieu : la disparition de l'important gradient de pH artificiel est directement responsable de cette synthèse. Cette expérience constitua historiquement une preuve directe de la **théorie chimiosmotique** développée par P. Mitchell.

3.4.1. Photophosphorylation non cyclique

La force proton-motrice résultant du gradient de protons est responsable aussi bien de la phosphorylation oxydative mitochondriale que de la photophosphorylation chloroplastique. Dans ce dernier cas, la disposition des photosystèmes I et II, ainsi que celle des transporteurs d'électrons qui interviennent entre eux, est telle que des protons sont prélevés dans le stroma et propulsés dans le sac thylakoïdien, lors d'une étape de transfert d'électrons suffisamment energétique. Le complexe « protéine Fe-S/cyt.b/cyt.f » est ici responsable du pompage des protons à travers la membrane ; de plus, la photolyse de l'eau produit des H^+ restant dans la cavité (seuls les électrons sont transportés) et contribue aussi largement à l'acidification de ce compartiment. L'origine double des protons qui forment le gradient est illustrée sur la *figure* 10.14.

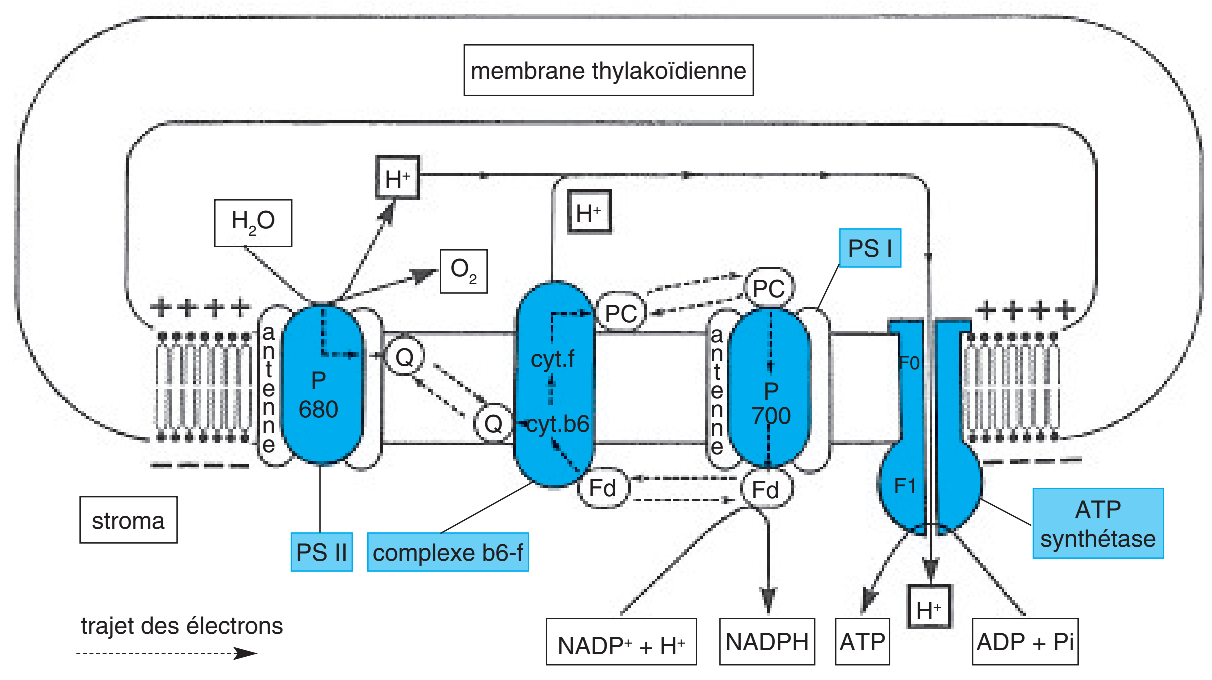


Figure 10.14

Organisation de la membrane thylakoïdienne des chloroplastes des Végétaux supérieurs

Les photosystèmes I et II, ainsi qu'un gros complexe d'oxydoréduction membranaire (dit complexe b6-f), participent à la capture de la lumière et à la création du gradient de protons qui est exploité par l'ATP synthétase pour fabriquer l'ATP. La plastocyanine (PC) et la ferrédoxine (Fd) sont des protéines mobiles transportant des électrons ; la plastoquinone (Q) est un transporteur d'hydrogène.

Les particules de type F0/F1 (ATP synthétases) présentes dans les sacs thylakoïdiens sont orientées de telle façon que les têtes F1 sont tournées vers l'extérieur des sacs. De même que dans les mitochondries, la particule F0 joue le rôle d'un canal à travers lequel les protons réintégrent leur milieu d'origine, c'est-à-dire le stroma. Il existe néanmoins une différence avec les mécanismes se déroulant au sein des mitochondries ; dans ces dernières, les têtes F1 sont tournées vers l'intérieur du sac constitué par la membrane interne (vers la matrice) et c'est l'espace intermembranaire qui s'acidifie. Dans les chloroplastes, elles sont tournées vers l'extérieur des sacs thylakoïdiens (vers le stroma) et c'est la cavité de ces derniers qui s'acidifie lorsque le gradient est formé. Dans les deux cas, cependant, l'ATP est synthétisé dans un espace où il est métaboliquement utile : la matrice mitochondriale ou le stroma chloroplastique. Un sac thylakoïdien est donc l'équivalent structural et fonctionnel d'une crête mitochondriale qui se serait détachée de la membrane interne, et refermée sur elle-même. Il faut signaler ici que tout l'ATP fabriqué dans les chloroplastes est utilisé sur place pour la synthèse des sucres, et qu'il n'est pas exporté, à la différence de ce qui se passe pour les mitochondries.

La synthèse d'ATP qui vient d'être décrite est associée à la photolyse de l'eau et à la production de NADPH, le flux des électrons étant continu de l'un à l'autre, le long de la chaîne, à travers les deux photosystèmes : c'est la raison pour laquelle on parle de **photophosphorylation non cyclique**. Grâce à la technique de cryofracture et cryodécapage, les complexes protéiques mis en œuvre dans ces processus apparaissent comme des protubérances caractéristiques à la surface des membranes thylakoïdiennes ou granaires. Leur localisation au sein de ces membranes est la suivante :

– les ATP synthétases sont réparties à la surface de toutes les membranes, à l'exception de celles qui participent aux accolements, dans les grana ;
– les complexes Fe-S/cyt.b/cyt.f sont uniformément répartis sur toutes les membranes granaires et intergranaires ;
– le PS I est localisé à 80 % dans les membranes intergranaires et granaires non accolées, tandis que le PS II est localisé à 85 % dans les membranes accolées des grana.

Cette disposition non homogène des complexes, en particulier celle des PS I et II qui échangent des électrons, pose le problème du transfert de ces derniers de l'un à l'autre. On a montré que ce sont en fait les transporteurs mobiles intermédiaires : plastoquinone et plastocyanine, qui se déplacent dans l'épaisseur ou à la surface de la bicouche lipidique de la membrane, et qui assurent les transports d'électrons à longue distance. Ceci implique une grande fluidité membranaire, qui est permise grâce à une forte proportion en galactolipides insaturés.

3.4.2. Photophosphorylation cyclique

À côté du processus non cyclique, il existe un mécanisme de synthèse d'ATP ne mettant pas en jeu la photolyse de l'eau et le photosystème II, et n'aboutissant pas ainsi à la formation de pouvoir réducteur : il s'agit de la **photophosphorylation cyclique**. Lorsque la quantité de $NADP^+$ est insuffisante et qu'il n'y a pas d'accepteur terminal d'électrons, un court-circuit se met en place, qui renvoie les électrons excités du PS I à lui-même, à travers une série de transporteurs empruntant partiellement la voie normale entre PS I et PS II (voir *figure* 10.12). Le gradient de protons est entretenu et la synthèse d'ATP reste possible, mais comme le PS I se régénère lui-même, avec ses propres électrons, il n'est pas fait appel au PS II et à l'eau ; il n'y a donc pas de dégagement d'O_2 et de production de NADPH. Les électrons tournent en circuit fermé et la lumière, agissant sur le centre réactionnel P_{700} du PS I, est le moteur de cette machine à fabriquer de l'ATP seul.

3.5. Réduction du CO_2 et cycle de Calvin-Benson

Toutes les réactions précédentes nécessitent l'intervention de la lumière ; leur bilan est la transformation d'une forme d'énergie physique (les photons) en une forme d'énergie biologique (l'ATP) et la synthèse d'une molécule organique réduite : le NADPH. Il n'y a pas eu, jusqu'à présent, intervention du CO_2 et de synthèse de sucres : ceci implique une deuxième catégorie de réactions (phase sombre), qui utilisent les deux molécules citées plus haut, et n'ont donc pas directement besoin de lumière. Cette phase n'est pas indépendante de la phase lumineuse, et les deux types de métabolisme ont en fait lieu simultanément dans les chloroplastes illuminés. La vitesse de la photosynthèse est en général limitée par les réactions sombres car la courbe traduisant cette vitesse en fonction de l'intensité lumineuse atteint, après une

phase de proportionnalité où la lumière est limitante, un plateau variable avec la concentration en CO_2 dans l'atmosphère. Plus cette concentration est élevée, et plus l'intensité photosynthétique est importante pour une intensité lumineuse donnée ; dans les conditions normales de concentration (0,036 %), le CO_2 est clairement le facteur limitant pour la plupart des Végétaux.

3.5.1. Fixation du CO_2 et formation du 3-phosphoglycérate

Une série d'expériences commencée en 1945 par M. Calvin et son équipe a permis d'élucider les réactions biochimiques conduisant à la réduction du CO_2, et de déterminer son accepteur organique initial.

Encart historique

Les expériences de Calvin et Benson

Le principe utilisé est celui des expériences de type *pulse*, sans chasse (voir chapitre 3) ; le matériel végétal était constitué par des algues vertes unicellulaires, faciles à cultiver de façon reproductible. Les cultures d'algues éclairées étaient mises en présence de CO_2 radioactif ($^{14}CO_2$) pendant des temps très brefs, puis immédiatement tuées par ébullition dans l'alcool. Après extraction des cellules, les composés organiques étaient analysés par chromatographie bidimensionnelle sur papier, puis autoradiographie. Les taches radioactives sur le cliché indiquent la présence de molécules ayant incorporé du ^{14}C dans leur formule pendant le temps de l'incubation. Il s'est avéré que des temps de contact de seulement 5 secondes avec le marqueur suffisaient pour que l'on ait une réponse en ce qui concerne la nature des toutes premières molécules fixant le CO_2 marqué. Des durées de quelques dizaines de secondes donnaient déjà des informations très brouillées, en ce sens qu'un grand nombre de molécules radioactives avaient été formées à partir du précurseur initial radioactif. Près de dix ans furent nécessaires à l'équipe de Calvin pour terminer l'identification chimique de toutes les taches.

La première molécule marquée apparaissant sur les autoradiogrammes fut identifiée comme l'**acide 3-phosphoglycérique**, molécule déjà rencontrée dans la glycolyse ; l'hypothèse initiale fut donc simplement qu'un composé à deux carbones constituait la molécule acceptrice du CO_2 atmosphérique. Il s'est avéré que c'était en fait une molécule en C5 qui fixait le CO_2 ; il s'agit du **ribulose 1,5-bisphosphate**, qui est un dérivé phosphorylé du ribulose-phosphate (molécule appartenant aussi à la voie des hexoses-monophosphates ; voir chapitre 7). La réaction mise en jeu conduit à une molécule en C6 qui est hydrolysée en deux molécules d'acide phosphoglycérique, une seule des deux étant marquée au niveau de son carboxyle (voir *figure* 10.15).

L'enzyme catalysant cette réaction capitale, spécifique des organismes photosynthétiques, est nommée **ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase** ; on l'appelle aussi RUBISCO (CO pour « carboxylase/oxygénase » ; ce point sera expliqué un peu plus loin). Cette molécule géante (10 nm de diamètre) a une masse moléculaire de 555 kDa ; elle est constituée de huit petites (15 kDa) et huit grosses sous-unités (55 kDa) qui sont codées par des génomes différents, l'un localisé dans le noyau cellulaire, l'autre dans l'organite lui-même. Cette enzyme est très concentrée dans le stroma des chloroplastes et représente jusqu'à 50 % des protéines cellulaires totales ; elle constitue la protéine la plus abondante dans la biosphère. Elle a la particularité d'être lente (d'où peut-être son abondance) car elle transforme seulement trois molécules de substrat par seconde, au lieu des 10^3 au minimum, pour une enzyme habituelle.

3.5.2. Utilisation du 3-phosphoglycérate et synthèse des hexoses. Le cycle de Calvin-Benson

L'acide 3-phosphoglycérique est à la source de toutes les molécules organiques générées par la photosynthèse ; il permet de fabriquer des sucres en C6 en utilisant en fait la voie de la **gluconéogenèse**, décrite dans le chapitre 7. C'est ici qu'interviennent les deux molécules fabriquées pendant la phase claire de la photosynthèse, l'ATP et le NADPH. Deux réactions qui les impliquent sont obligatoirement mises en jeu pour remonter vers le fructose 6-phosphate : un ATP et un NADPH sont consommés par triose, à ce niveau, pour donner du **glycéraldéhyde 3-phosphate**. Si le principe de la fixation du CO_2 est très simple, en revanche la question qui reste posée est celle de la nécessaire

Ribulose 1–5 bisphosphate

Composé transitoire à 6 C
rapidement hydrolysé

Phosphoglycérate

Figure 10.15
Fixation du CO_2 sur le ribulose 1,5-bisphosphate
Cette réaction, catalysée par la RUBISCO, produit deux molécules d'acide 3-phosphoglycérique. Ce composé est le premier obtenu au cours de la photosynthèse chez les plantes en C3.

régénération de la molécule acceptrice du CO_2 dans la phase sombre : le ribulose 1,5-bisphosphate. Il s'agit en fait de reconstituer des molécules en C5 à partir de molécules généralement en C3 ou en C6. Ceci se réalise grâce à une série d'interconversions de molécules voisine de celle de la voie des hexoses-monophosphates ; cet ensemble de réactions, qui se déroule dans le stroma des chloroplastes, constitue le **cycle de Calvin-Benson**. Celui-ci implique l'utilisation de 12 ATP et 12 NADPH (pour la fixation du CO_2 dans 12 trioses), et de six ATP supplémentaires pour phosphoryler les six pentoses-phosphates et les régénérer en six pentoses-bisphosphates. Le bilan net de ce cycle complexe est l'incorporation de six molécules de CO_2 (au cours de six tours de cycle) pour donner une molécule organique en C6. Pour plus de détails, voir un ouvrage de Biochimie.

Si l'on admet que deux photons sont captés simultanément par chaque photosystème pour propulser les deux électrons nécessaires à la formation de 1 NADPH (soit quatre photons en tout), on peut calculer le bilan énergétique de l'acte photosynthétique. Une molécule de glucose demande, pour sa synthèse, la fabrication de 12 NADPH et de 18 ATP, soit la consommation de 48 photons. Connaissant le contenu énergétique d'un photon de longueur d'onde moyenne de 600 nm, et l'énergie potentielle contenue dans une molécule de glucose, on calcule un rendement de 30 %.

Le premier ose fabriqué par le cycle de Calvin est un triose : le glycéraldéhyde 3-P. Ce composé hydrosoluble ne peut pas s'accumuler dans le stroma du chloroplaste, car l'augmentation de sa concentration y provoquerait rapidement une élévation importante de la pression osmotique interne. Deux solutions sont possibles :

– soit les **trioses phosphates** sont exportés hors de l'organite, en empruntant un **transporteur** spécifique de la membrane interne ;
– soit il y a synthèse, au sein du stroma, d'une macromolécule de stockage : l'**amidon**, qui ne change pas l'osmolarité du contenu du plaste.

Les mécanismes de synthèse du saccharose et de l'amidon ont été traités dans le chapitre 7 et ne seront pas décrits à nouveau.

3.6. La photosynthèse en C4 chez les plantes tropicales

Toutes les plantes vertes ne possèdent pas le type de métabolisme photosynthétique que l'on vient de décrire. Vers le milieu des années 60, Hatch et Slack ont en effet démontré que chez certaines plantes d'origine tropicale, comme le maïs ou la canne à sucre, ce sont des molécules à 4C (acides dicarboxyliques), et non à 3C, qui apparaissent les premières marquées lors de la fixation du CO_2 radioactif. Ces plantes sont désignées **plantes en C4**, par opposition aux **plantes en C3** des zones tempérées et fraîches, qui présentent le métabolisme déjà analysé.

3.6.1. Un exemple de coopération métabolique tissulaire

L'assimilation du CO_2 chez ces plantes est intéressante car elle met en jeu deux types cellulaires coopérant au sein des tissus chlorophylliens. En effet, contrairement aux plantes en C3, dont toutes les cellules des parenchymes chlorophylliens ont les mêmes propriétés, les feuilles des plantes en C4 possèdent deux sortes de cellules qui diffèrent à la fois par des caractères structuraux et physiologiques (voir *figure* 10.16). Les cellules du **mésophylle** et celles de la **gaine périvasculaire** (entourant les vaisseaux conducteurs) montrent un polymorphisme chloroplastique très net. Les chloroplastes des cellules du mésophylle sont d'aspect classique, avec des grana typiques et nombreux ; ceux des cellules de la gaine ont des sacs thylakoïdiens très allongés, espacés, sans grana évidents, et ils contiennent des grains d'amidon abondants (voir *figure* 10.17). D'un point de vue physiologique, ces deux types d'organites et de cellules ne font pas du tout la même chose, comme le montrent des expériences menées sur des cellules isolées expérimentalement.

La première réaction mise en jeu chez les plantes en C4 est la carboxylation du phosphoénolpyruvate en **oxaloacétate**, qui a lieu dans les cellules du mésophylle. Cette réaction est catalysée par une enzyme hyaloplasmique : la phosphoénolpyruvate carboxylase. Première molécule formée par fixation du CO_2, l'oxaloacétate est très rapidement converti en malate ou en aspartate, selon les espèces. Ces composés sont ensuite exportés vers les cellules voisines de la gaine, à travers des ponts cytoplasmiques (plasmodesmes) qui les font communiquer. Les chloroplastes des cellules du mésophylle sont dépourvus de RUBISCO ; ils assurent cependant les réactions claires habituelles et fabriquent de l'ATP et du NADPH, qui sont utilisés dans le cadre de ce métabolisme particulier (voir plus loin).

Les cellules de la gaine périvasculaire prennent en charge les deux composés en C4 importés et commencent par les décarboxyler, au sein de leurs chloroplastes particuliers, pour donner du pyruvate et du CO_2, lequel se dissout dans la phase aqueuse. Le pyruvate retourne ensuite vers les cellules du mésophylle, tandis que le CO_2 libéré dans les cellules de la gaine périvasculaire y alimente le cycle de Calvin normal, avec fixation sur le ribulose 1,5-bisphosphate, tel qu'on l'a décrit plus haut ; il

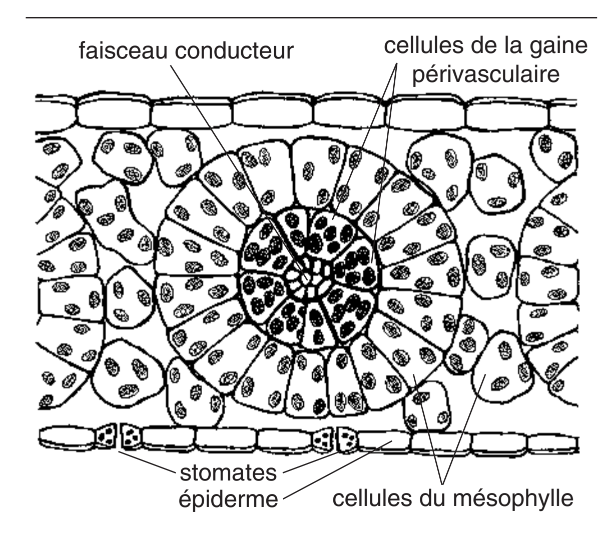


Figure 10.16

Coupe d'une feuille de plante en C4

Localisation des cellules de la gaine périvasculaire (autour des faisceaux conducteurs) et des cellules du mésophylle.

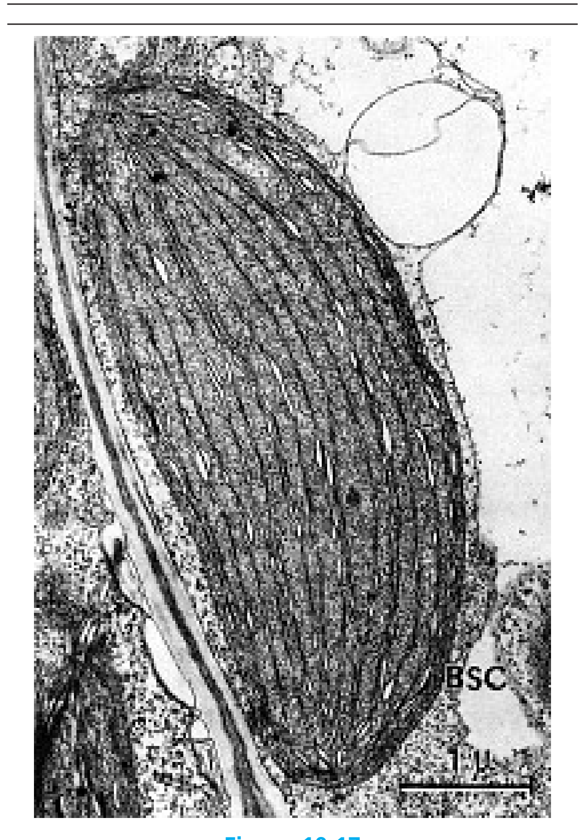


Figure 10.17

Ultrastructure d'un chloroplaste de gaine périvasculaire de feuille de maïs

Noter l'aspect particulier des sacs thylakoïdiens, allongés, très espacés et ne présentant pas de grana. Cliché J. Brangeon.

fournit des trioses phosphates, des hexoses et même de l'amidon. Grâce à leurs thylakoïdes atypiques, ces cellules fabriquent de l'ATP pour faire tourner ce cycle (le NADPH étant obtenu au cours de la décarboxylation du malate en pyruvate).

Après son retour dans les chloroplastes des cellules du mésophylle, le pyruvate est phosphorylé en phosphoénolpyruvate (grâce à l'ATP formé par les grana) et l'accepteur primaire du CO_2 est ainsi régénéré : la boucle est fermée (voir *figure* 10.18).

3.6.2. Une adaptation physiologique

On comprend mal *a priori* l'intérêt physiologique de ce système complexe d'interconversions et d'échanges entre compartiments et cellules (nommé **cycle de Hatch et Slack**), qui consomme en outre de l'énergie sous forme d'ATP ! L'explication du métabolisme des plantes en C4 est en fait à chercher du côté de leur écologie et de leur adaptation. Toutes les plantes en C4 (soit plus de 100 espèces connues à l'heure actuelle) sont originaires des régions tropicales chaudes et arides. La température élevée et la faible hygrométrie de ces milieux imposent aux plantes de fermer leurs stomates épidermiques au maximum dans la journée, pour éviter les pertes d'eau par transpiration. Ceci a pour conséquence une très faible entrée d'air et donc une concentration tissulaire moyenne en CO_2 très basse (10 fois moins que celle de l'air atmosphérique). Dans ces conditions, la RUBISCO est peu efficace pour fixer le CO_2 (voir plus loin), et la photosynthèse fonctionne mal. Les plantes en C4 tournent cette difficulté car :

- la phosphoénolpyruvate carboxylase est une enzyme fonctionnant très bien à faible teneur en CO_2 : dans les cellules du mésophylle, elle peut se contenter du faible CO_2 ambiant pour réaliser sa fixation ;
- la libération du CO_2 fixé sous forme de malate, par décarboxylation dans les cellules de la gaine, y réalise localement une concentration en CO_2 qui atteint 10 fois celle de l'air atmosphérique. Ceci permet à la RUBISCO de fonctionner à plein régime et dans des conditions bien meilleures même que celles rencontrées par les plantes en C3 des zones tempérées, où le CO_2 tissulaire et le CO_2 ambiant sont à peu près à l'équilibre de concentration.

Dans les zones tropicales, où la lumière est abondante et les températures élevées, la teneur atmosphérique en CO_2 devient en outre un facteur limitant de la photosynthèse ; le cycle de Hatch et Slack permet donc de diminuer l'effet de ce phénomène de limitation. Ce processus est plus exigeant en ATP (30 molécules contre 18, pour un hexose), mais comme la RUBISCO fonctionne plus efficacement que dans les plantes en C3, les plantes en C4 ont au bout du compte un rende-

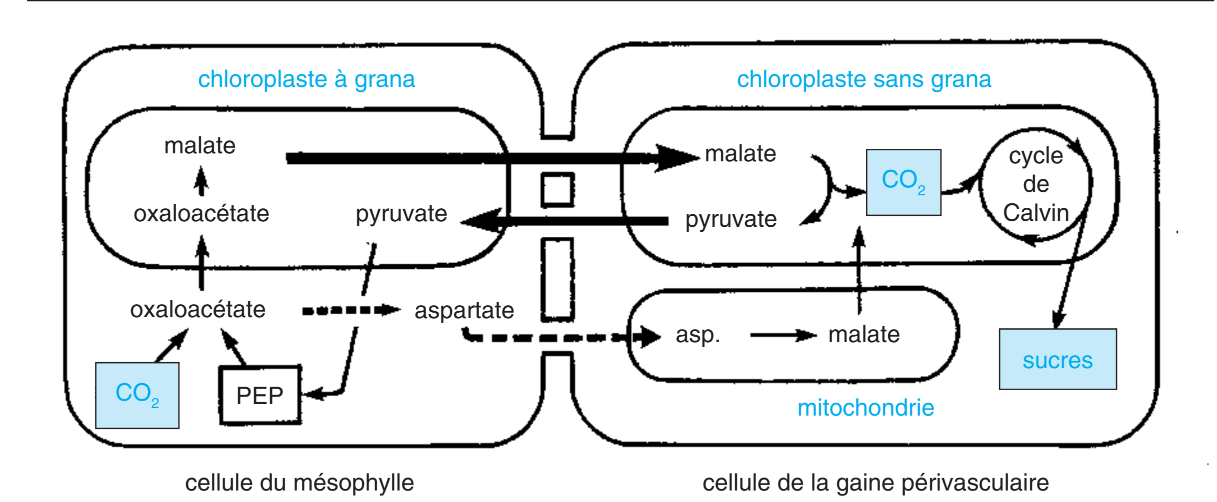


Figure 10.18

Principe du métabolisme photosynthétique des plantes en C4

Observer les interactions entre compartiments d'une même cellule et les échanges de métabolites entre cellules différentes (PEP : phosphoénolpyruvate). Seuls les plastes de la gaine périvasculaire possèdent de la RUBISCO.

ment en production primaire plus élevé que les précédentes. On peut rapprocher de ce métabolisme un autre type de stratégie photosynthétique, nommée **CAM** (*crassulacean acid metabolism*), mise en évidence chez des plantes grasses adaptées aux régions arides, et dont le principe a été décrit dans le chapitre 7.

4. AUTRES FONCTIONS DES MITOCHONDRIES ET DES PLASTES. INTÉGRATION DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE ET INTERMÉDIAIRE

4.1. Synthèse et dégradation de métabolites variés

4.1.1. Oxydation des acides gras et synthèse de l'acétyl-CoA dans les mitochondries

En dehors des phospholipides et des glycolipides membranaires, les acides gras existent dans les cellules essentiellement sous forme de triglycérides. Ces molécules extrêmement réduites constituent une source d'énergie considérable : $\Delta G°'$ de l'oxydation complète de l'acide palmitique = – 9 781 $kJ.mol^{-1}$. Les acides gras représentent environ 40 % du combustible brûlé par un Homme en régime alimentaire normal.

• Étapes biochimiques de la **β-oxydation**. Les acides gras naturels contiennent un nombre pair de carbones, ce qui tient à leur mode de synthèse impliquant des chaînons dicarbonés. De même, leur dégradation se réalise en décrochant successivement des chaînons dicarbonés (CH_3–COOH, ou résidus acétyle) à partir de l'extrémité COOH ; toutes les étapes mises en jeu sont catalysées par des enzymes de la matrice mitochondriale (la question de la pénétration des acides gras dans l'organite sera traitée plus tard). Ces chaînons ne sont pas directement libérés mais sont associés au coenzyme A pour former de l'acétyl-CoA, comme dans l'oxydation du pyruvate (voir le cycle de Krebs). Ce processus d'amputation récurrente des acides gras est désigné sous le nom de **β-oxydation**. La première réaction subie par l'acide gras de départ est une activation sous la forme d'un acyl-CoA qui nécessite l'hydrolyse d'un ATP et l'intervention d'une molécule de coenzyme A ; cette étape, couplée au transport dans la matrice mitochondriale, est catalysée par une **acyl-CoA synthétase**.

L'enlèvement d'un acétyl-CoA nécessite quatre opérations successives : 1) une oxydation, *via* une enzyme à coenzyme FAD ; 2) une hydratation ; 3) une oxydation, *via* une enzyme à coenzyme NAD^+ et 4) l'intervention d'un coenzyme A. Cette série récurrente de réactions est parfois désignée du nom de son découvreur, «hélice ou spirale de Lynen» (1955). Les coenzymes réduits $FADH_2$ et NADH se réoxydent aisément sur la chaîne respiratoire puisque toutes ces réactions sont catalysées au sein de la matrice. De même, chaque acétyl-CoA formé par tour de cycle est susceptible d'entrer dans le cycle de Krebs et d'être métabolisé selon le processus déjà décrit. Le bilan énergétique de la combustion complète d'un acide palmitique, en tenant compte de l'ATP qui est consommé au départ, est le suivant :

$$\text{Palmitate} + 23\ O_2 + 129\ \text{ADP} + 129\ \text{Pi} \rightarrow 16\ CO_2 + 145\ H_2O + 129\ \text{ATP}$$

Les 129 ATP fabriqués représentent au total un $\Delta G°'$ d'hydrolyse de 3 937 $kJ.mol^{-1}$; le rendement énergétique de la combustion complète du palmitate est donc de 0,4 (efficacité voisine de celle calculée pour le glucose). Contrairement à ce qui se passe pour l'oxydation des sucres (où CO_2 produit = O_2 consommé), le rapport O_2/CO_2 est ici supérieur à 1. Les acides gras insaturés sont, quant à eux, oxydés selon un mécanisme analogue à celui décrit pour les saturés, mais quelques réactions supplémentaires sont au préalable nécessaires pour éliminer les doubles liaisons présentes initialement dans la molécule. Il faut enfin noter que ces réactions fournissent une grande quantité d'eau (145 molécules pour un palmitate) ; en fait, c'est ainsi que le chameau stocke virtuellement de l'eau dans sa bosse, sous la forme d'une grande quantité de graisse accumulée !

• **Activation et transport des acides gras** dans la mitochondrie. Les réserves lipidiques étant localisées dans le hyaloplasme, se pose le problème du transfert des acides gras dans la matrice mitochondriale ; c'est un processus complexe mettant en jeu au moins cinq enzymes différentes localisées dans les divers compartiments mitochondriaux (voir

figure 10.19). La membrane externe contient les acyl-CoA synthétases qui activent les acides gras grâce à l'ATP et au coenzyme A ; les acyl-CoA se trouvent simultanément transférés dans l'espace intermembranaire, selon un mécanisme encore mal connu. Dans cet espace est aussi située l'enzyme nommée adénylate-kinase, qui recycle l'AMP produit par la réaction précédente en catalysant la réaction : ATP + AMP → 2 ADP (ces derniers vont se recharger dans la mitochondrie en empruntant le transporteur ADP/ATP ; voir plus loin). La membrane interne porte trois enzymes chargées de faire passer l'acyl-CoA dans la matrice ; ce mécanisme fait en outre intervenir une petite molécule organique : la carnitine. L'acyl-CoA, qui est maintenant dans la matrice, est pris en charge par les enzymes de la β-oxydation qui le dégradent selon le schéma vu plus haut. On a là un bel exemple de relation entre une organisation structurale et des fonctions métaboliques.

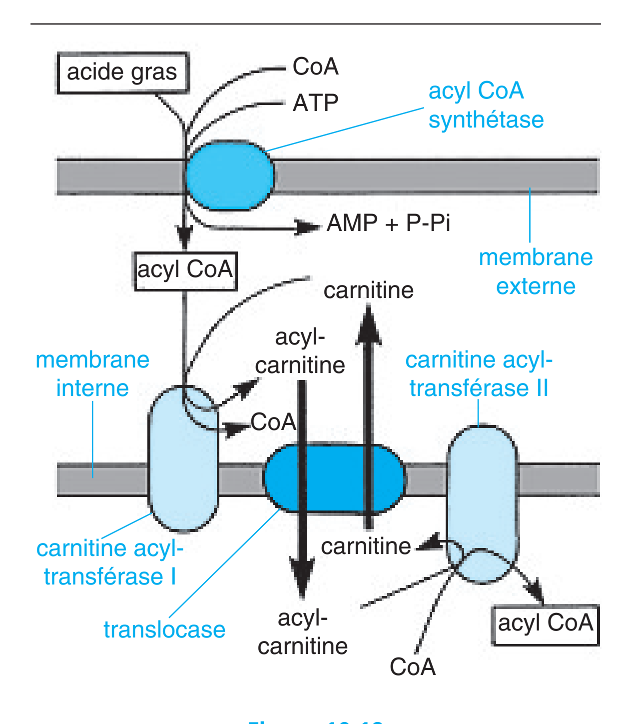


Figure 10.19

Transfert des acyl-CoA à travers la membrane mitochondriale interne

(1) une carnitine-acyltransférase de la face externe (I) accroche une molécule de carnitine à l'acyl-CoA et donne de l'acyl-carnitine (le CoA est recyclé) ; **(2)** un transporteur spécifique de l'acyl-carnitine assure son passage à travers la membrane ; **(3)** une carnitine-acyltransférase de la face interne (II) réagit avec l'acyl-carnitine venant de rentrer et le CoA, selon la réaction inverse de la précédente, et redonne l'acyl-CoA et la carnitine (qui ressort de la matrice).

4.1.2. Utilisation par les mitochondries d'acides aminés pour alimenter le métabolisme énergétique

Lorsque les acides aminés fournis par la ration alimentaire sont en excès par rapport aux besoins liés à la croissance ou au simple renouvellement permanent des protéines, ceux-ci sont dégradés et utilisés comme aliments énergétiques et/ou convertis en glucose ou acides gras. Cette remarque vaut surtout pour les Animaux adultes, qui ont une masse constante ; en effet, chez les êtres unicellulaires qui se divisent rapidement et régulièrement, ou chez les Végétaux dont la croissance est continue, le métabolisme de synthèse utilisant les acides aminés prédomine nettement sur le métabolisme dégradatif. Le catabolisme de ces molécules est biochimiquement complexe car il y a autant de voies dégradatives qu'il y a d'acides aminés différents ; on peut cependant donner quelques mécanismes généraux et indiquer les principales voies de convergence de ce métabolisme.

La première étape consiste à éliminer la fonction amine de la molécule afin de récupérer le chaînon carboné restant. Cette élimination consiste en un transfert du NH_2 sur un acide organique accepteur, qui est le plus souvent l'acide α-cétoglutarique (intermédiaire du cycle de Krebs) : on obtient ainsi un acide α-cétonique, qui dépend de l'acide aminé de départ, et une molécule d'acide glutamique ; on parle de réaction de **transamination**, catalysée par une transaminase. Ces enzymes existent dans le hyaloplasme, où commence la dégradation des acides aminés, mais on en trouve également dans la matrice mitochondriale. L'acide pyruvique sert aussi d'accepteur dans de nombreuses réactions de transamination ; il donne alors de l'alanine qui décharge ensuite son NH_3 sur l'acide α-cétoglutarique, ce qui nous ramène à la réaction précédente. Le groupement NH_3 de nombreux acides aminés se retrouve ainsi dans des molécules d'acide glutamique, qui est lui-même finalement désaminé au sens strict, selon une réaction de **désamination oxydative** faisant intervenir le NAD^+ ; on obtient de l'acide α-cétoglutarique + NH_4^+ + NADH + H^+.

Une partie du NH_4^+ ainsi formé est utilisable par les cellules pour la synthèse de composés azotés, mais comme une concentration trop élevée de cet ion est toxique pour les cellules, le reste doit être éliminé de l'organisme. Celui-ci est éliminé tel quel, sous forme dissoute, chez les organismes

aquatiques (dits **ammonotéliques**), soit sous forme d'urée chez les Vertébrés terrestres **uréotéliques**, après intervention d'une série de réactions dont l'ensemble constitue le **cycle de l'urée** (uréogenèse). Ce cycle, qui se déroule à cheval sur le hyaloplasme et la mitochondrie, est une nouvelle illustration de la façon dont le métabolisme doit être coordonné au niveau des différents compartiments cellulaires. Les animaux **uricotéliques** excrètent leur azote sous forme d'acide urique, qui nécessite très peu d'eau pour être éliminé : il s'agit des Oiseaux, des Reptiles, de nombreux Invertébrés terrestres (Insectes, Arachnides), etc.

La deuxième étape consiste à dégrader complètement les chaînons carbonés issus de la désamination pour produire de l'énergie. La stratégie générale de cette dégradation consiste à former des intermédiaires métaboliques branchés sur le cycle de Krebs ou secondairement dérivés vers la synthèse du glucose ou des acides gras. Les squelettes carbonés des vingt acides aminés sont en fait ramenés à sept molécules seulement, qui sont soit des intermédiaires du cycle de Krebs, soit des molécules y donnant directement accès (voir chapitre 7).

De nombreux intermédiaires de ces chaînes de dégradation servent de précurseurs pour les synthèses de composés cellulaires essentiels (cholestérol, certains coenzymes, hormones...) ou accessoires (pigments) ; on voit encore une fois combien le catabolisme et l'anabolisme sont étroitement imbriqués, au niveau de voies et de branches latérales. Il faut ajouter que les voies de dégradation des acides aminés ne sont pas l'« inverse » des voies de biosynthèse, même s'il existe des réactions communes. On connaît chez l'Homme un grand nombre de maladies génétiques correspondant à des déficiences enzymatiques de certaines étapes de ce métabolisme dégradatif. L'accumulation de métabolites intermédiaires toxiques conduit souvent à des désordres pathologiques sévères (s'accompagnant parfois de retard mental) que seuls des régimes alimentaires stricts permettent de réduire : phénylcétonurie, alcaptonurie, etc (voir chapitre 4).

4.1.3. Production par les mitochondries de précurseurs pour diverses biosynthèses

Le cycle de Krebs est une plaque tournante du métabolisme dégradatif, puisqu'il brûle aussi bien les glucides, les acides gras ou les acides aminés ; il est en outre la source de nombreux précurseurs utilisés pour réaliser des biosynthèses très variées. Ce cycle est dit **amphibolique** car il a des relations à la fois avec le catabolisme et avec l'anabolisme. Les principaux précurseurs prélevés sont les acides oxaloacétique et malique (4C) et α–cétoglutarique (5C), qui servent à fabriquer des acides aminés (voir chapitre 7). Le cycle ne peut donc continuer à tourner que si d'autres réactions l'alimentent, afin de compenser les fuites latérales. On appelle **réactions anaplérotiques** ces voies qui réapprovisionnent le cycle en diacides ; outre les réactions liées au métabolisme dégradatif des acides aminés, il en existe une, qui est très importante car elle permet la fixation du CO_2 (même dans les cellules animales) :

$$\text{acide pyruvique} + CO_2 + ATP + H_2O \rightarrow \text{acide oxaloacétique} + ADP + Pi$$

Cette réaction se déroule dans la matrice mitochondriale et consomme de l'ATP ; grâce à elle, il y a toujours assez d'oxaloacétate pour pouvoir capter l'acétyl-CoA et faire fonctionner le cycle de Krebs (voir *figure* 7.5).

Un exemple d'anabolisme directement lié au fonctionnement du cycle de Krebs est celui de la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques, ou **gluconéogenèse**, dont la description a été donnée dans le chapitre 7. Celle-ci illustre bien la notion de collaboration métabolique entre compartiments cellulaires et d'intégration des activités chimiques dans la cellule. Dans un même ordre d'idées, on peut revenir brièvement sur le **cycle de l'urée** (qui a lieu dans le foie des animaux uréotéliques), signalé plus haut au sujet du devenir des ions $NH4^+$ issus de la désamination des acides aminés. Une relation étroite existe entre le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative et le cycle de l'urée ; d'une part, plusieurs molécules d'ATP sont consommées dans cette séquence réactionnelle, d'autre part, l'acide fumarique est un intermédiaire commun aux deux cycles (bien qu'intervenant à la fois dans la mitochondrie et dans le hyaloplasme).

4.1.4. Fonctions des chloroplastes autres que la synthèse des sucres

Une des fonctions majeures des chloroplastes est la **réduction des nitrates** et des sulfates, qu'ils transforment en acides aminés, avec l'aide des produits carbonés de la respiration ou de la photosynthèse. La majeure partie des Végétaux utilise des précurseurs minéraux de l'azote et du soufre

(NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+ et SO_4^{2-}), qu'ils prélèvent dans la solution du sol ou l'eau. Les enzymes mises en jeu sont localisées soit sur la membrane externe de l'enveloppe des plastes (nitrate réductase), soit dans le stroma (nitrite réductase), soit sur les membranes thylakoïdiennes (réduction du soufre). Dans le cas de l'azote, après fixation du NH_4^+ sur la glutamine, diverses transaminations sont mises en jeu au sein du stroma, qui produisent de l'alanine, de la sérine, de l'acide aspartique, etc. ; de même, la réduction de SO_4^{2-} y donne de la cystéine et de la méthionine. Toutes ces réactions consomment de l'ATP, du NADPH et des chaînons carbonés fabriqués sur place ou importés.

Un autre type important de synthèses a lieu dans ces organites : celle des acides gras et de nombreux phospholipides. On a montré que la synthèse de tous les acides gras et de tous les phospholipides cellulaires, ainsi que les glycolipides spécifiques aux thylakoïdes, a lieu au sein des chloroplastes ; la désaturation des premiers, en revanche, met en œuvre des systèmes enzymatiques membranaires extérieurs. La synthèse et l'accumulation de lipides dans les **oléoplastes**, à partir d'acétyl-CoA relèvent de ce même métabolisme ; les **leucoplastes** fabriquent, quant à eux, des précurseurs isopréniques nécessaires à la synthèse des essences et des résines. Ce métabolisme s'oppose radicalement à celui des mitochondries, qui doivent importer tous leurs phospholipides membranaires constitutifs, à l'exception du diphosphatidyl-glycérol, fabriqué sur place ; la phosphatidyl-choline et la phosphatidyl-sérine y sont importées du réticulum lisse au moyen de protéines échangeuses particulières.

4.2. Échanges de métabolites entre mitochondries et hyaloplasme

La synthèse de l'ATP dans les mitochondries selon le mécanisme chimiosmotique implique que celles-ci se comportent comme des vésicules imperméables à tous les ions. Leur membrane interne est infranchissable, par simple diffusion, par un grand nombre de molécules organiques ; par exemple, les coenzymes $NAD(P)^+$ ou NAD(P)H, ou bien les nucléotides AMP, CDP, CTP, GDP, GTP ne peuvent la traverser. Comment se font donc les échanges de métabolites entre la matrice mitochondriale et le hyaloplasme, qui assurent la nécessaire alimentation de la mitochondrie en substrats respiratoires ou qui, dans l'autre sens, fournissent au reste de la cellule l'ATP fabriqué dans l'organite ? Deux mécanismes sont en jeu : les transporteurs et les navettes.

4.2.1. Transporteurs membranaires

Tous les ions ou métabolites qui doivent franchir la membrane mitochondriale interne, tels que l'ADP, le Pi, l'ATP ou les acides organiques (pyruvate, malate, citrate, etc.) utilisent des **transporteurs membranaires** spécifiques. Ces protéines sont intégrées dans l'épaisseur de la membrane interne et fonctionnent en général selon le principe du cotransport. Ce mécanisme, qui implique l'échange simultané de deux ions ou molécules, a été exposé à l'occasion de l'étude des transports membranaires (voir chapitre 6). Dans le cas du **symport**, deux ions minéraux ou bien un ion minéral et une molécule organique sont acheminés en même temps et dans le même sens par la protéine porteuse ; c'est le cas, par exemple, pour : H^+ et Pi ($H_2PO_4^-$), H^+ et Ca^{2+}, H^+ et pyruvate. Dans le cas de l'**antiport**, les ions ou molécules sont transportés en sens inverse : c'est en particulier la situation du **transporteur ADP/ATP**, qui échange une molécule contre l'autre. Cette protéine a un rôle essentiel dans le fonctionnement de la mitochondrie puisqu'elle permet à la fois la fourniture de l'ADP à la matrice et l'exportation de l'ATP hors de l'organite. De même, on a montré l'existence de transporteurs échangeant spécifiquement les acides organiques dicarboxyliques du cycle de Krebs (succinate, fumarate, malate) ou bien les acides tricarboxyliques (citrate, isocitrate). Certains acides aminés (glutamate, aspartate) sont également échangés selon un mécanisme identique.

Dans ces échanges, il faut insister sur le rôle moteur du gradient de protons créé par la respiration. Ce sont en effet les protons qui, dans le cas des symports, permettent le passage simultané d'un autre ion ou d'un métabolite, éventuellement contre son gradient de concentration propre, en utilisant l'énergie du gradient électrochimique (**transport actif secondaire**). Il est clair que tous ces ions H^+ qui ne passent pas par les canaux des ATP synthétases ne participent pas à la synthèse de l'ATP, ce qui rend très théorique le bilan énergétique présenté pour la combustion complète du glucose. Le couplage «gradient de protons/transport» est évidemment supprimé lorsqu'il n'y a pas d'oxydations respiratoires. Le mode très particu-

lier de transport des acides gras a déjà fait l'objet d'un développement spécifique dans ce chapitre. Il existe enfin une autre façon pour les mitochondries de faire pénétrer certains métabolites : c'est le système dit des **navettes**.

4.2.2. Navettes

En conditions anaérobies, le NADH produit par la glycolyse se réoxyde en cédant ses électrons au pyruvate pour donner soit de l'éthanol, soit du lactate. Lorsque l'oxygène est présent, les processus respiratoires assurent la réoxydation des coenzymes réduits produits au sein des mitochondries ; mais qu'advient-il de ceux qui sont produits dans le hyaloplasme par la glycolyse, en l'absence de régénération fermentaire ? Les coenzymes ne peuvent pas traverser la membrane mitochondriale interne, comme le montre l'expérience suivante : si on ajoute du NADH à une suspension de mitochondries isolées, il n'est pas oxydé bien que ces mêmes organites soient capables de métaboliser et d'oxyder rapidement des substrats nécessitant ce coenzyme précis (le malate ou le citrate, par exemple). Les cellules disposent en fait de systèmes permettant de récupérer le pouvoir réducteur produit dans le hyaloplasme afin de l'oxyder au sein des mitochondries : il s'agit de ce qu'on appelle les **navettes**. La plus simple d'entre elles est la navette du glycérol-phosphate/dihydroxyacétone-phosphate, qui permet d'échanger un NADH contre un $FADH_2$, entre les deux compartiments (voir *figure* 10.20) ; le bilan de l'opération se solde cependant par une perte d'énergie potentielle car on ne fabrique que deux ATP au lieu des trois possibles.

Un autre type de navette réalise un échange réel de NADH entre hyaloplasme et matrice : il s'agit de la navette malate/aspartate, dont le fonctionnement complexe ne peut être décrit ici (voir l'ouvrage de biochimie cité plus haut). La différence majeure avec la navette précédente est que celle-ci fonctionne de façon unidirectionnelle, alors que la seconde réalise des échanges de pouvoir réducteur dans les deux sens. Ceci est important à noter car certaines chaînes de biosynthèse hyaloplasmiques (synthèse du glucose à partir du pyruvate, synthèse des acides gras) peuvent consommer de grandes quantités de pouvoir réducteur issu des mitochondries, sous forme de NADH ou de NADPH, qui sont interconvertibles. Des mécanismes de transport équivalents existent évidemment pour les plastes, et y sont même encore plus développés, dans la mesure où le métabolisme de ces organites est très diversifié, comme on l'a vu plus haut ; nous ne pouvons les décrire dans le cadre de ce manuel. Il faut souligner simplement le fait important qu'il n'existe pas d'échangeur ADP/ATP chez les chloroplastes.

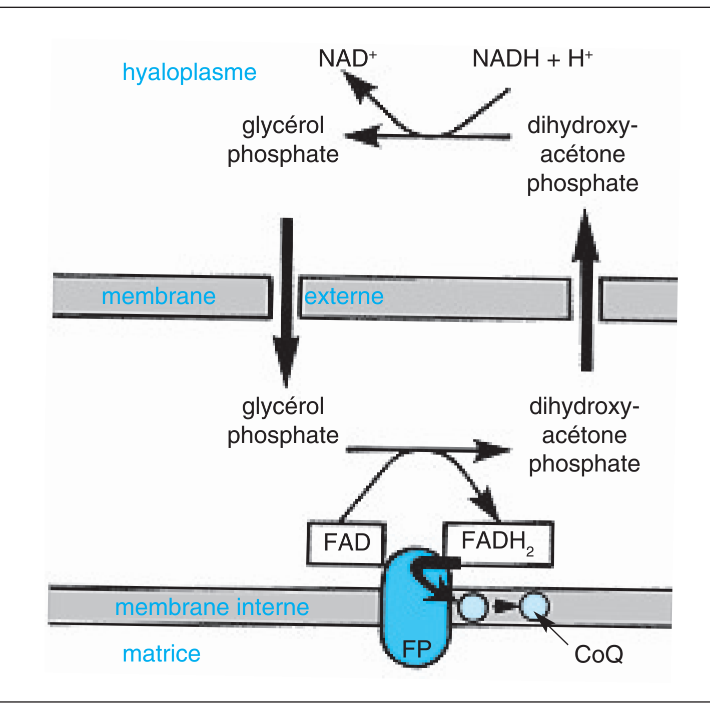


Figure 10.20
Fonctionnement d'une navette mitochondriale

Le dihydroxyacétone-P produit par la glycolyse est réduit enzymatiquement par le NADH en glycérol-P dans le hyaloplasme. Ces deux composés franchissent aisément la membrane externe grâce aux pores qu'elle contient. Sur la face externe de la membrane interne de l'organite existe une protéine (FP) à coenzyme d'oxydoréduction à FAD, qui se réduit en $FADH_2$ tout en oxydant le glycérol-P en dihydroxyacétone-P ; ce dernier retourne ensuite dans le cytoplasme. Le $FADH_2$ cède ses électrons à la chaîne des transporteurs d'oxydoréduction membranaires classiques, au niveau du coenzyme Q (CoQ).

5. LES PEROXYSOMES : DES ORGANITES À FONCTION OXYDATIVE NON GÉNÉRATEURS D'ÉNERGIE

5.1. Organisation ultrastructurale. Généralités

Ces organites, universellement répandus chez les Eucaryotes, limités par une seule membrane épaisse de 6 nm, ont une forme en général sphérique et un diamètre allant de 0,2 à 1,5 µm de diamètre. Leur cavité est remplie d'une matrice amorphe et dense au sein de laquelle s'individualise parfois une grosse structure cristalline de nature protéique ; ils ne contiennent pas de matériel génétique propre (voir *figure* 10.21). Bien que leur découverte date de 1954 dans le rein de souris, et leur purification de 1966, c'est depuis peu de temps seulement que l'on apprécie leur importance croissante dans les cellules. De même que pour les lysosomes, leur identification cytologique précise ne peut se faire que sur des critères enzymatiques révélés par les techniques cytoenzymologiques (voir chapitre 3). La purification de ces organites par fractionnement cellulaire est relativement délicate car leur séparation des lysosomes et des mitochondries par simple centrifugation s'avère impossible. Seule l'utilisation de gradients de densité et de marqueurs enzymatiques appropriés permet de résoudre le problème (voir chapitre 7)

Chez les Animaux, les peroxysomes ne se rencontrent en abondance que dans certains tissus : par exemple, essentiellement le foie et les reins, chez les Mammifères ; de plus, leur composition enzymatique, et donc leur physiologie, sont différentes selon le tissu considéré. Malgré une certaine uniformité morphologique et structurale, il existe vraiment un polymorphisme biochimique de ces organites. De même, les peroxysomes des Animaux inférieurs, des Végétaux ou des Protistes ont des caractéristiques spécifiques (voir plus loin). Lorsque des cellules de levures sont cultivées en présence de méthanol comme seule source de carbone, elles présentent de volumineux et très spectaculaires peroxysomes cubiques dans leur cytoplasme. Il existe chez l'Homme plusieurs maladies génétiques graves associées à des dysfonctionnements des peroxysomes, ce qui

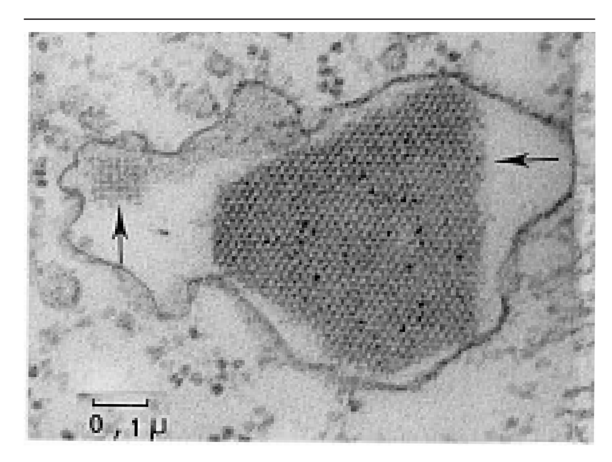


Figure 10.21

Ultrastructure d'un peroxysome de cellule végétale

Exemple pris dans une cellule d'euphorbe ; noter la membrane limitante simple, la matrice amorphe et la présence d'une structure cristalline de nature protéique (× 73 000). Cliché J. Orcival (Orsay).

témoigne du caractère essentiel de leurs fonctions. Divers composés chimiques naturels (hormones stéroïdes, thyroïdiennes, etc.) ou artificiels (médicaments, produits de l'industrie des plastiques, pesticides), sont connus pour provoquer une multiplication importante des peroxysomes au sein des cellules. De façon générale, ces organites sont associés à des fonctions oxydatives ; un grand nombre de métabolites y sont dégradés grâce à des enzymes originales et le type d'activité qui s'y déroule pourrait refléter un métabolisme très ancien (voir chapitre 16).

5.2. Fonctions des peroxysomes chez les Animaux

Deux grandes familles d'enzymes (membranaires ou matricielles) coexistent toujours dans les peroxysomes : il s'agit d'oxydases (enzymes d'oxydoréduction) flaviniques à coenzyme de type FMN ou FAD, nommées **flavoprotéines**, et de **peroxydases**. Les premières consomment de l'oxygène moléculaire, c'est-à-dire l'utilisent comme accepteur terminal d'électrons pour oxyder divers substrats organiques en produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 : eau oxygénée) ; elles sont donc auto-oxydables. Les secondes, parmi lesquelles il faut citer la **catalase**, toujours présente, utilisent l'H_2O_2 formé comme substrat pour oxyder d'autres composés organiques, en donnant H_2O. En l'absence de ces derniers, la catalase assure une

dismutation de H_2O_2, qui produit O_2 ($2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$). La plupart des peroxydases sont des protéines à fer héminique. Le principe est donc celui d'une chaîne d'oxydoréduction simple impliquant deux composés R1 et R2, qui sont successivement oxydés avec production d'H_2O, au dépens d'une consommation d'O_2 :

$$R1H_2 + \mathbf{O_2} \rightarrow R1 + H_2O_2$$
flavoprotéine

$$R2H_2 + H_2O_2 \rightarrow R2 + 2\ \mathbf{H_2O}$$
peroxydase

Une telle cascade rappelle donc ce qui se passe dans les mitochondries, mais la différence fondamentale est que ces deux réactions ne produisent aucune énergie chimique utilisable pour les cellules : toute l'énergie libre est dépensée en chaleur. La dégradation instantanée, sur place, de H_2O_2 est une nécessité absolue pour les cellules, car ce composé est hautement nocif (source de radicaux libres) vis-à-vis des composés organiques qui les constituent. Les peroxysomes des cellules de Vertébrés contiennent des flavoprotéines susceptibles d'oxyder un grand nombre de substrats grâce à O_2 : α-hydroxyacides (acides lactique, hydroxybutyrique, glycolique, glycérique), purines (hypoxanthine, xanthine), acide urique, acides aminés D, polyamines, acides gras poly-insaturés, cholestérol, etc. Grâce à H_2O_2, les peroxydases et la catalase oxydent à leur tour les composés phénoliques, des alcools (éthanol, méthanol, propanol), l'acide formique, les acides gras (α-oxydation), etc. Dans les hépatocytes, la catalase constitue à elle seule 40 % des protéines des peroxysomes.

Chez les Vertébrés, la dégradation des bases puriques en acide urique, puis en $CO_2 + NH_4^+$, est un exemple classique de voie faisant intervenir les peroxysomes ; les enzymes mises en jeu sont : la xanthine oxydase (à fer et molybdène) et l'uricase (à cuivre, et qui forme des structures cristallines dans le foie de rat). La signification biologique d'une D amino-oxydase peroxysomale chez les Eucaryotes n'est pas claire, dans la mesure où ces acides aminés n'existent pas dans les protéines. Certaines réactions catalysées dans les peroxysomes des Animaux interviennent dans la détoxification des cellules : en rendant des molécules toxiques hydrosolubles, ceci favorise leur élimination par la voie sanguine et urinaire (le foie et les reins sont en contact avec de gros volumes sanguins). La **β-oxydation** des acides gras se déroule dans les peroxysomes de tous les Eucaryotes ; comme dans les mitochondries, elle implique quatre réactions, mais la première, une oxydation, y est catalysée par une flavoprotéine auto-oxydable donnant H_2O_2 et non $FADH_2$. L'acétyl-CoA ainsi obtenu sort des organites, grâce à un transporteur approprié, et rejoint les mitochondries où le chaînon acétyl sera totalement dégradé.

5.3. Les peroxysomes des Végétaux supérieurs et leur importance physiologique

L'équipement enzymatique des peroxysomes végétaux est beaucoup plus varié que celui des Animaux, en particulier dans le cas des organes verts ; outre des oxydases, on y trouve des aminotransférases (intervenant dans le cycle glyoxylique : glutamate/glyoxylate ; sérine/α-cétoglutarate ; voir plus loin), des ammonium-lyases... Certains d'entre eux sont spécialisés dans le métabolisme des acides gras, qu'ils contribuent à transformer en glucides.

5.3.1. Photorespiration et voie peroxysomale du glycolate

En utilisant de l'O_2 marqué, on montre que les plantes vertes, à la lumière, consomment de l'oxygène selon un mécanisme qui n'a rien à voir avec la respiration mitochondriale classique. En fait, ce phénomène est lié au fonctionnement photosynthétique des chloroplastes eux-mêmes ; cette « respiration lumineuse », ou **photorespiration**, n'engendre pas d'ATP, n'est pas sensible aux inhibiteurs habituels, et consiste en réalité en une déviation de la fixation du CO_2 par la RUBISCO. Curieusement, cette enzyme accepte aussi bien le CO_2 que l'O_2 comme substrats : le site actif est le même et les deux gaz entrent en compétition pour la réaction, en fonction de leurs concentrations relatives. La réaction d'oxygénation du ribulose bisphophate donne un 3-phosphoglycérate et un **2-phosphoglycolate**. Dans les conditions normales, la RUBISCO fonctionne presque autant comme oxygénase que comme carboxylase, de sorte qu'il peut s'en suivre une perte de rendement de la photosynthèse atteignant 50 %. Ce gâchis métabolique ne produit aucune énergie et, au contraire, en consomme lors de la régénération du ribulose bis-

phosphate ; l'intensité de la photorespiration est estimée à 5 fois celle de la respiration normale, la nuit, du même tissu. Pour plus de détails, voir l'ouvrage de Biochimie cité plus haut.

Le phosphoglycolate ainsi produit est déphosphorylé dans le stroma du chloroplaste, puis le **glycolate** quitte ce dernier et gagne un peroxysome situé à proximité. Les coupes cytologiques montrent le plus souvent, en effet, que ces deux organites sont souvent très proches, voire contigus au sein du hyaloplasme. Les peroxysomes des cellules vertes sont toujours très volumineux et contiennent, comme on l'a dit plus haut, des oxydases flaviniques qui oxydent le glycolate en **glyoxylate**, en présence d'O_2. Le peroxyde d'hydrogène obtenu est immédiatement dégradé par une catalase. Le glyoxylate est alors pris en charge par une transaminase qui, en interagissant avec un glutamate, le transforme en **glycine**. Cette dernière passe dans une mitochondrie voisine où elle donne du CO_2 et de la **sérine**, laquelle retourne dans un peroxysome ; dans celui-ci, une nouvelle transamination conduit à de l'hydroxypyruvate, qui est transformé en **glycérate**. Enfin, ce dernier retourne dans un chloroplaste où il rentre dans le cycle de Calvin, après phosphorylation.

La photorespiration est donc un métabolisme très particulier, qui met en œuvre trois organites distincts coopérant étroitement pour consommer de l'O_2 et produire du CO_2, tout en consommant de l'énergie ; son seul intérêt physiologique évident est de produire des acides aminés (glycine et sérine) pour la synthèse protéique. Elle est également à l'origine, au sein des peroxysomes, de l'**acide oxalique** qui sera finalement accumulé dans les vacuoles de certaines cellules, sous forme de volumineux cristaux d'oxalate de calcium (cas de certains cactus, de l'oseille, de l'épinard, de la rhubarbe, et de nombreuses autres espèces végétales).

5.3.2. Les glyoxysomes et l'utilisation des lipides

Les **glyoxysomes** sont des peroxysomes particuliers rencontrés chez les Animaux inférieurs, les Protistes et les Végétaux. Ils sont particulièrement abondants dans les cellules des graines en germination des plantes oléagineuses (ricin, par exemple), dont les réserves sont essentiellement constituées de lipides. Outre les enzymes de la β-oxydation des acides gras signalés plus haut, les glyoxysomes possèdent les enzymes du **cycle** dit **glyoxylique**, qui est une variante du cycle de Krebs (voir *figure* 10.22). Deux enzymes spécifiques : l'isocitrate lyase et la malate synthétase permettent de faire entrer deux molécules d'acétyl-CoA dans ce cycle et de fabriquer à partir d'elles une molécule de succinate. Celui-ci quitte le peroxysome et gagne ensuite la matrice des mitochondries (grâce à des transporteurs appropriés) où il participe à la **néoglucogenèse** et à la synthèse de glucose hyaloplasmique, source d'énergie utilisée par la graine ou la plantule en développement. Le bilan de ce cycle est la conversion des acides gras en glucides, opération impossible chez les Animaux supérieurs qui sont dépourvus de l'équipement enzymatique adéquat, les deux enzymes clefs étant absentes de leurs peroxysomes. Il faut noter que ce cycle fonctionne aussi chez de nombreux Procaryotes.

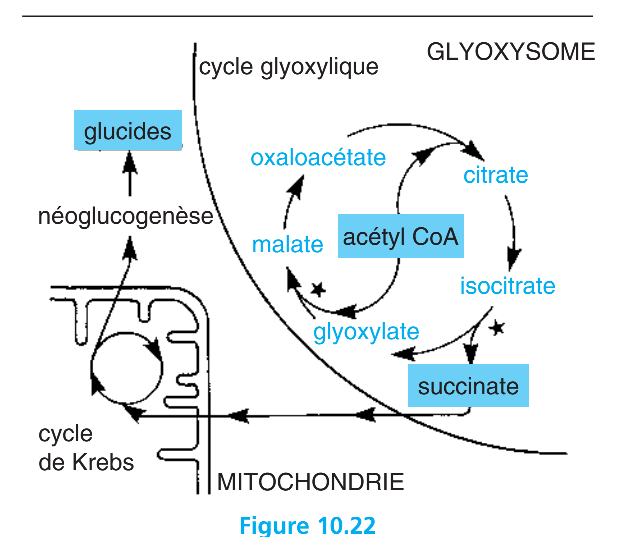


Figure 10.22

Étapes du cycle glyoxylique

Ce cycle existe chez certaines cellules eucaryotiques (où il fait intervenir les glyoxysomes et les mitochondries) et chez de nombreux Procaryotes ; il permet la conversion des acides gras en glucides. Les deux astérisques indiquent les réactions spécifiques de ce cycle.

Perspective biomédicale

Les maladies mitochondriales

On connaît depuis longtemps diverses maladies liées à un dysfonctionnement mitochondrial : le premier exemple fut décrit en 1962 chez une femme présentant un hypermétabolisme dû à un défaut de couplage entre le transport des électrons et la phosphorylation au sein des muscles striés. Etant donnée la diversité des enzymes nécessaires au métabolisme des mitochondries, il est normal que l'on ait décrit un grand nombre de symptômes associés à leur déficience. On rappelle que plus de 80 polypeptides (dont 13 seulement sont codés par l'ADNmt) interviennent dans les seuls processus d'oxydation phosphorylante et que l'expression et la réplication de l'ADNmt sont sous le contrôle de protéines codées par le noyau.

Les patients atteints par ces maladies sont affectés au niveau d'organes ayant une demande aérobie élevée (par ordre décroissant : cerveau, muscles squelettiques, cœur, foie). Les phénotypes cliniques et biochimiques sont souvent complexes, ainsi que leur évolution. Au plan du diagnostic, ces maladies se traduisent parfois par des anomalies visibles en cytologie : mitochondries anormalement nombreuses et grosses, présence d'inclusions atypiques, développement exagéré des membranes internes, aspect en lambeaux des fibres musculaires striées.

Les causes génétiques de ces anomalies sont d'origine double : mutations du génome nucléaire et mutations du génome mitochondrial. Tous les modes de transmission sont donc observables : transmission purement maternelle, ou bien mendélienne, autosomique ou liée au sexe. La séquence de l'ADN mitochondrial humain ayant été publiée en 1981, de nombreuses corrélations entre anomalies de ce génome et pathologies ont pu être faites dès 1988. Divers syndromes neuromusculaires ont d'abord été caractérisés chez l'adulte, correspondan t à des mutations ponctuelles (hérédité maternelle), ou des délétions et des duplications (apparition dite sporadique).

La maladie de Leber et les syndromes nommés MERRF (*myoclonic epilepsy and ragged red muscle fiber*) et MELAS (*mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes*) appartiennent à la première catégorie. Dans ce cas, tous les descendants d'une mère malade sont atteints, mais seule la descendance des filles sera affectée à son tour. La neuropathie de Leber est une cécité bilatérale, précoce et rapide, due à une dégénérescence du nerf optique ; elle est liée le plus souvent à une mutation faux sens dans le gène de la sous-unité 4 de la NADH déshydrogénase (quatre mutations ont aussi été identifiées dans trois autres gènes). La maladie nommée MERRF se traduit par des mouvements anormaux et très invalidants des membres ; la gravité des manifestations cliniques varie selon les sujets. Cette maladie est due à l'existence d'une mutation ponctuelle dans un ARNt mitochondrial (lys). Il en va de même pour la maladie MELAS, qui est une encéphalomyopathie (ARNt leu). La synthèse des protéines mitochondriales nécessaires à la phosphorylation oxydative s'en trouve donc gravement affectée.

Les maladies suivantes sont liées à des délétions de segments parfois très longs de l'ADNmt (jusqu'à 7 kb, soit près de la moitié du génome). Elles apparaissent de façon sporadique, et ne présentent pas de continuité génétique claire ; elles sont sans doute dues à des mutations spontanées au cours du développement embryonnaire. Le syndrome de Kearns-Sayre est une ophtalmoplégie progressive, doublée d'une rétinite, débutant précocément. Sortant du cadre neuromusculaire, la maladie de Pearson affecte l'hématopoïèse et le pancréas.

Du point de vue génétique, la situation de toutes ces maladies diffère, selon que l'on observe soit une homoplasmie (toutes les molécules d'ADNmt de toutes les cellules, sont mutées ; ex : Leber), ou bien une hétéroplasmie (mélange de molécules normales et mutées dans les cellules ; ex. : MERRF). Dans ce dernier cas, on comprend que des proportions variables de ces molécules (réparties aléatoirement, lors des divisions cellulaires) puissent expliquer la plus ou moins grande sévérité des symptômes, selon les tissus ou les individus touchés.

Résumé

Les mitochondries et les plastes sont des organites bien individualisés, qui occupent en général un volume important dans les cellules. Bien que de taille fort différente, ces organites présentent un plan d'organisation voisin : tous deux possèdent une enveloppe constituée de deux membranes (au moins), des systèmes membranaires internes très développés et un matériel génétique propre. Au plan métabolique, ils constituent des compartiments où se déroulent de très nombreuses réactions chimiques ayant pour fonction de convertir une forme d'énergie en une autre ; directement ou indirectement, ils fournissent de l'ATP aux cellules, afin qu'elles accomplissent toutes leurs activités.

Les mitochondries utilisent des molécules organiques déjà élaborées, de natures très diverses (pyruvate, acides gras, acides aminés), pour en tirer, après oxydation complète grâce à l'oxygène de l'air, toute l'énergie contenue dans leurs liaisons chimiques : c'est la respiration cellulaire. Le cycle de Krebs, qui se déroule dans la matrice, assure la dégradation complète de résidus acétyl et fournit du CO_2 et du pouvoir réducteur, sous forme de coenzymes réduits ; ceux-ci alimentent une chaîne d'oxydoréduction dont les étapes exergoniques sont à l'origine de la fourniture d'énergie. Les chloroplastes captent, grâce à leurs pigments variés, une source d'énergie physique, la lumière, et la convertissent en énergie chimique sous la forme de molécules organiques (sucres) : c'est la photosynthèse.

Le mécanisme biochimique fondamental mis en œuvre dans ces deux organites est très voisin et basé sur l'existence de systèmes membranaires présentant une asymétrie structurale et fonctionnelle remarquables. Les transporteurs d'électrons et d'hydrogène mitochondriaux, ainsi qu'un système équivalent dans les chloroplastes, sont à l'origine d'un gradient transmembranaire de protons qui est exploité par les ATP synthétases pour fabriquer l'ATP. Ce dernier est exporté hors des mitochondries pour alimenter le métabolisme cellulaire, tandis qu'il est utilisé directement dans les chloroplastes pour fabriquer des glucides.

Il existe deux grandes familles de plantes photosynthétiques : les plantes en C3, qui fixent directement le CO_2 dans des précurseurs de sucres, et les plantes en C4 qui fixent transitoirement le CO_2 dans des acides organiques. Ce dernier type de métabolisme, d'une grande complexité, implique des interactions multiples entre organites différents au sein de deux types cellulaires, ainsi que des échanges de métabolites entre eux.

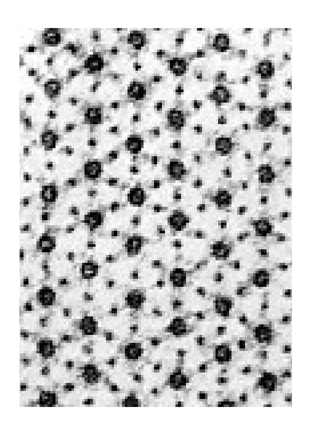
Outre leurs fonctions énergétiques directes, ces organites jouent un rôle important dans le métabolisme, en permettant la synthèse et la dégradation de nombreux composés. Les mitochondries interviennent ainsi dans l'utilisation des acides aminés et dans leur transformation en glucides ; les chloroplastes ont la capacité unique de fixer l'azote minéral pour fabriquer des acides aminés. Toutes ces activités impliquent, au niveau des membranes de ces organites, des systèmes de transport de molécules ou d'ions très efficaces.

Les peroxysomes sont des organites unimembranaires impliqués dans des réactions d'oxydoréduction très variées, mais non génératrices d'énergie. Deux types d'enzymes les caractérisent : des oxydases flaviniques, qui consomment de l'O_2, et des peroxydases ; les secondes détruisent l'H_2O_2 produite par les premières, ou bien l'utilisent dans des réactions d'oxydation de composés tels que alcools ou acides… La photorespiration, commune à tous les Végétaux verts, et le cycle glyoxylique, observé surtout chez les plantes oléagineuses, sont associés à des enzymes des peroxysomes.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Décrire l'organisation ultrastructurale des mitochondries et des chloroplastes ; souligner leurs points communs et leurs différences.
2. Nommer les différentes catégories de plastes rencontrés chez les Végétaux supérieurs et préciser leur rôle physiologique.
3. Qu'appelle-t-on différenciation mitochondriale ? donner quelques exemples de ce phénomène chez les Animaux.
4. Nommer les trois grandes étapes biochimiques permettant de définir la respiration cellulaire.
5. En quoi consiste le cycle de Krebs ? où se déroule-t-il dans la mitochondrie ? quel est son bilan complet en termes de molécules et d'énergie ?
6. Combien de complexes enzymatiques membranaires comprend la chaîne respiratoire ? nommer leurs principaux coenzymes transporteurs d'hydrogène et d'électrons.
7. Nommer les deux transporteurs mobiles d'hydrogène et d'électrons intervenant entre les gros complexes membranaires de la chaîne respiratoire.
8. Quelle est la particularité de la succinate-déshydrogénase, et comment la met-on en évidence *in vivo* ?
9. Quel est le résultat du transport spontané des électrons le long de la chaîne respiratoire ? comment sera-t-il exploité pour assurer la synthèse de l'ATP dans la mitochondrie ?
10. Décrire la dernière réaction chimique qui se déroule à la fin de la chaîne respiratoire, et qui conduit à la formation de l'eau.
11. Citer les principaux pigments intervenant dans la capture de la lumière chez les Eucaryotes photosynthétiques.
12. Qu'appelle-t-on photosystèmes ? quelles fonctions biochimiques essentielles leurs différentes parties assurent-elles ? combien en existe-t-il de types différents chez les Végétaux supérieurs ?
13. Décrire le schéma traduisant le transport photosynthétique non cyclique des électrons ; quels sont les moteurs permettant aux électrons de remonter l'échelle des potentiels d'oxydoréduction ?
14. Quel est le nom donné à la théorie unitaire rendant compte des phénomènes impliqués dans la phosphorylation oxydative ou photosynthétique ayant lieu dans les mitochondries, les chloroplastes et chez les Bactéries ?
15. Nommer la molécule qui sert d'accepteur du CO_2 dans la photosynthèse des plantes en C3, ainsi que celle qui résulte de cette fixation ; quelle est l'enzyme responsable de cette réaction ?
16. En quoi consiste le cycle de Calvin-Benson ? quel est son rôle fondamental dans la photosynthèse ?
17. Quelles sont les différences cytologiques et physiologiques existant entre les plastes des cellules du mésophylle et ceux des cellules de la gaine périvasculaire (plantes en C4) ?
18. Quelles particularités cellulaires remarquables sont mises en jeu dans le métabolisme photosynthétique des plantes en C4 ? en quoi ce métabolisme constitue-t-il une adaptation physiologique aux climats arides ?
19. Pourquoi peut-on dire que l'acétyl-coenzyme A est une «plaque tournante» dans le métabolisme énergétique ?
20. Selon quelles réactions les acides gras sont-ils dégradés dans la matrice mitochondriale ?
21. Citer un transporteur de la membrane mitochondriale interne dont l'importance est fondamentale dans toutes les activités cellulaires.
22. Quelles grandes familles d'enzymes rencontre-t-on dans les peroxysomes ? citer une enzyme toujours présente dans ces organites et justifier sa présence.
23. Quelle est l'origine biochimique de la photorespiration ? quelle est sa conséquence en ce qui concerne l'efficacité de la photosynthèse ?
24. Chez quels êtres vivants rencontre-t-on des glyoxysomes et quelle est leur fonction physiologique originale ?



Chapitre 11

ARCHITECTURE ET MOTILITÉ CELLULAIRES

À la différence des Bactéries, les cellules eucaryotiques présentent un degré d'organisation interne très élevé (voir chapitre 2) et une grande diversité de formes, y compris au sein d'un même organisme (voir chapitre 14). De plus, elles sont capables de déplacer leurs organites à l'intérieur du hyaloplasme et, au moins pour certaines d'entre elles, de se mouvoir à l'aide de structures spécialisées ou en modifiant leur forme. Toutes ces propriétés sont liées à l'existence, chez ces cellules, de trois types de réseaux protéiques superposés, formés de fins filaments ou de tubules qui parcourent et emplissent le hyaloplasme.

Chaque type de filament est constitué de monomères différents, dont la taille est de l'ordre du nanomètre, et qui s'associent par milliers pour former des structures linéaires atteignant des longueurs de plusieurs micromètres.

Contrairement à ce que l'on a longtemps cru, ce dernier n'est pas en effet une simple solution concentrée de protéines ; il est en réalité fortement structuré par un système complexe appelé cytosquelette, qui joue un double rôle dans la cellule. De façon un peu trompeuse, en raison de sa dénomination, ce réseau interne constitue à la fois un «squelette» et une «musculature» à l'échelle cellulaire. Les microtubules et les microfilaments sont le plus souvent associés aux fonctions dynamiques du cytosquelette, mais ils entrent aussi dans la constitution de nombreux édifices stables. Ces structures ne pourraient assurer aucune fonction dans les cellules si elles n'étaient pas associées à de nombreuses protéines «accessoires» qui les relient aux organites ou à la membrane plasmique. En revanche, les filaments intermédiaires forment toujours des structures fibreuses stables qui ont un rôle essentiellement architectural ; ils n'ont été identifiés, jusqu'à présent, que dans les cellules animales. Les deux autres réseaux sont communs à tous les Eucaryotes.

Le cytosquelette n'existe pas chez les Procaryotes et il fait partie des différences majeures qui les distinguent des Eucaryotes, au même titre que l'organisation du matériel génétique, l'absence générale de systèmes membranaires internes ou le mode de reproduction. Les mécanismes de la motilité chez les Bactéries seront brièvement présentés en fin de chapitre ; ils sont basés sur des principes très différents de ceux décrits chez les Eucaryotes.

1. STRUCTURES CYTOSQUELETTIQUES DES CELLULES EUCARYOTIQUES

De façon inhabituelle dans la démarche cytologique, la description des constituants du **cytosquelette** sera d'abord faite au niveau des ultrastructures, observables au moyen du microscope électronique. Il faut en effet savoir que les éléments de base des trois réseaux signalés plus haut, invisibles à l'échelle de la microscopie photonique, ont été identifiés bien avant que les édifices,

pourtant de grande taille, auxquels ils participent, aient pu être reconnus. La raison en sera donnée plus loin.

1.1. Données de la microscopie électronique

1.1.1. Microtubules

Les **microtubules** sont des structures tubulaires en général rectilignes, ayant un diamètre extérieur de 25 nm, que l'on observe dans toutes les cellules eucaryotiques, quel que soit le stade du cycle cellulaire. Ils apparaissent typiquement sous forme de «rails», en coupe longitudinale, et sous forme circulaire, en coupe transversale (voir *figure* 11.1). L'observation de coupes sériées et l'utilisation de la coloration négative (voir chapitre 3), applicable dans quelques cas privilégiés, suggèrent que ces tubes peuvent atteindre de grandes longueurs (plusieurs dizaines de µm). Lorsque de très forts grossissements sont utilisés, leur paroi apparaît constituée de sous-unités globulaires, en général au nombre de treize. La technique de coloration négative appliquée à des microtubules isolés montre qu'ils sont formés de filaments élémentaires, nommés **protofilaments**, qui sont eux-mêmes constitués de sous-unités globulaires. On compte le plus souvent treize protofilaments par microtubule, mais cela n'est pas une règle absolue : chez certains Protistes, Nématodes et Crustacés, il en existe qui en possèdent de onze à quinze.

Dans les cellules animales en interphase (fibroblastes confluents en monocouche, par exemple) les microtubules sillonnent le hyaloplasme dans tous les sens, ou bien ils constituent des faisceaux lâches (cas des prolongements axonaux des neurones). Dans les cellules en division, ils sont les éléments de base des asters et du fuseau achromatique, sous la forme de faisceaux serrés et parallèles. Enfin, des édifices complexes tels que les centrioles des centrosomes, les corpuscules basaux des cils ou des flagelles ainsi que les cils et les flagelles eux-mêmes, contiennent des microtubules organisés en doublets ou en triplets parallèles (voir 3.3. et 3.4.). Bien que tous ces microtubules soient morphologiquement identiques, ils se classent cependant en deux catégories : ceux dits **labiles**, et ceux dits **stables**. Les premiers ne sont observables que si le matériel biologique a été fixé au moyen d'aldéhydes, à une température supérieure à 4°C ; les seconds sont visibles quels que soient les traitements fixateurs utilisés. Seuls les derniers types d'édifices complexes que l'on vient de citer sont constitués de microtubules stables.

Dans les cellules des Végétaux supérieurs, les microtubules ont une disposition très caractéristique : les coupes tangentielles à la limite cellulaire montrent qu'ils sont en général situés immédiatement sous la membrane plasmique et que leur

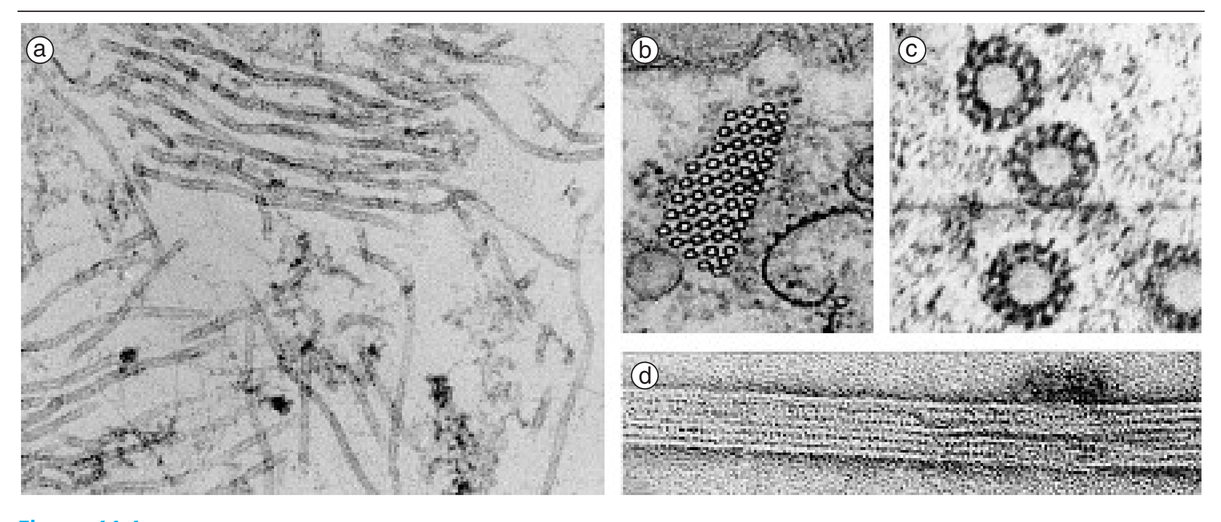


Figure 11.1

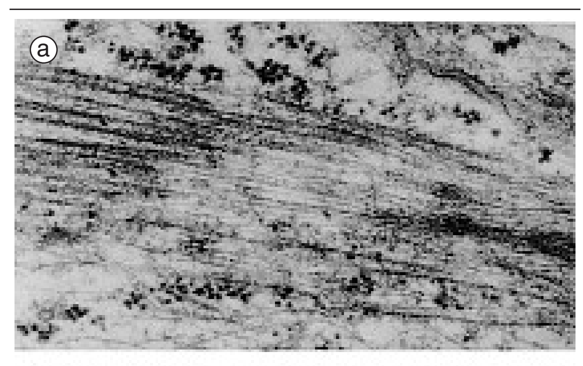
Microtubules observés en microscopie électronique

(a) coupe longitudinale (cellule de Protiste du genre *Euplotes* ; x 80 000) ; **(b)** coupe transversale d'un faisceau de microtubules (cellule de Protiste du genre *Anisonema* ; x 60 000) ; **(c)** coupe transversale à fort grossissement, montrant les 13 protofilaments constitutifs. Un microtubule est un long cylindre dont la paroi a 5 nm d'épaisseur ; **(d)** protofilaments observés en coloration négative (x 220 000). Clichés Labo. BG et M. Lemullois, Labo. BC4, Orsay.

orientation est à peu près parallèle à celle des fibrilles extracellulaires de cellulose de la paroi squelettique les plus proches de la membrane. Chez les Protistes, on observe de nombreuses structures microtubulaires, souvent très spectaculaires, comme les axonèmes constituant la partie axiale des prolongements cytoplasmiques (tentacules préhensiles) des Héliozoaires.

1.1.2. Microfilaments

Il s'agit de fines fibres de 7 à 8 nm d'épaisseur, que l'on trouve dans le hyaloplasme de toutes les cellules eucaryotiques, et qui se présentent le plus souvent sous la forme de faisceaux serrés (voir *figure* 11.2). Chaque **microfilament** ne dépasse généralement pas 2 à 3 µm de long, mais les faisceaux eux-mêmes atteignent 10 à 20 µm, comme on le verra plus tard. Ces derniers sont souvent localisés dans la zone corticale des cellules, en particulier celle en contact avec le substrat, quand il s'agit de cellules animales en culture. Certains types de cellules spécialisées contiennent des microfilaments en abondance, en particulier les **fibres musculaires**, qui sont des cellules allongées et contractiles caractéristiques des muscles striés ou lisses. Dans les fibres striées on décrit une succession remarquable de filaments fins et épais disposés en unités répétitives appelées **sarcomères**, dont nous rappellerons l'organisation et le fonctionnement dans le paragraphe 3.4.4. ; au sein des fibres lisses, ces associations ne présentent pas cette organisation caractéristique.



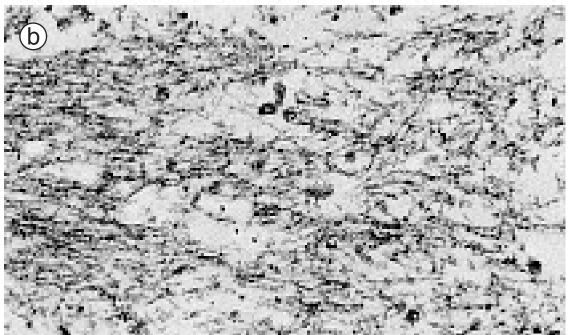


Figure 11.2

Microfilaments observés en microscopie électronique

(a) coupe longitudinale d'un faisceau serré de microfilaments observé dans une cellule de larve d'Amphibien ; **(b)** microfilaments organisés en un réseau lâche présent à la marge d'une cellule en culture. Clichés J. Auber et Labo. BG, Orsay.

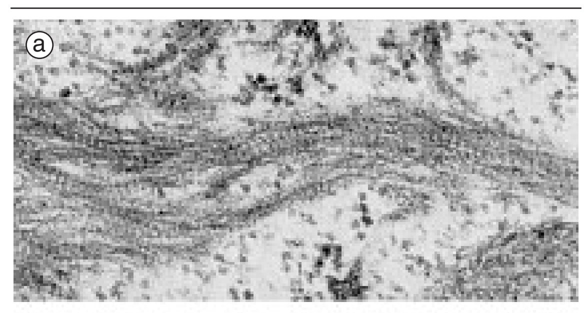
De nombreuses structures cellulaires, apparemment hétéroclites, contiennent aussi des microfilaments. Chez les Animaux, on peut citer : les microvillosités des cellules absorbantes, les stéréocils des cellules sensorielles auditives, le filament acrosomial des spermatozoïdes, les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales nommées ceintures d'adhérence, l'anneau contractile apparaissant à la fin de la division et permettant la séparation des cellules-filles, les divers prolongements cellulaires, appelés lamellipodes ou spicules, des cellules mobiles ou des cônes de croissance des axones en culture, etc. Certains de ces exemples seront décrits en détail dans le paragraphe 3.3.2.

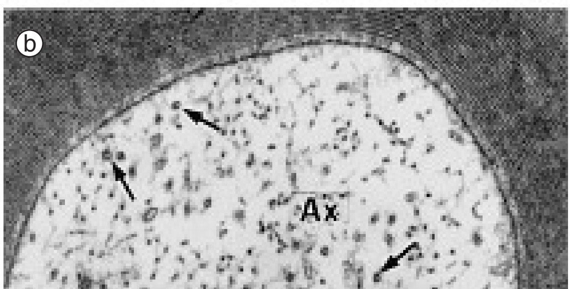
1.1.3. Filaments intermédiaires

Ils se présentent sous la forme de fibres d'épaisseur variable, comprise entre 8 et 12 nm. Cette variabilité est fonction du type cellulaire analysé et traduit une diversité de composition chimique qui sera étudiée plus loin ; celle-ci contraste avec l'uniformité de structure et de taille signalée pour les microtubules et les microfilaments. Les **filaments intermédiaires** ont été décrits depuis longtemps dans deux types majeurs de cellules animales : les cellules épithéliales des Vertébrés, en particulier les cellules épidermiques et leurs dérivés (cheveux, ongles, écailles…), et les cellules nerveuses : neurones ou cellules gliales (voir *figure* 11.3). Ces filaments y ont été respectivement décrits sous le nom de **tonofilaments** de kératine et de **neurofilaments** ; ces derniers s'agencent en faisceaux épais (neurofibrilles) bien visibles dans le corps cellulaire et dans les prolongements nerveux. Pratiquement tous les types cellulaires animaux contiennent des filaments intermédiaires.

1.1.4. Limites de l'approche

Nous avons souligné, dans le chapitre 2, les limites de l'observation en microscopie électro-





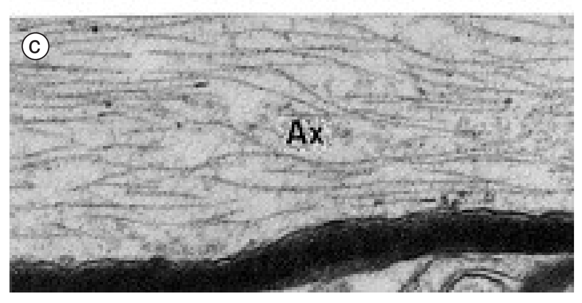


Figure 11.3

Filaments intermédiaires observés en microscopie électronique

(a) cellule épithéliale en culture : coupe longitudinale d'un faisceau de tonofilaments de kératine ; **(b)** et **(c)** coupes d'axones (Ax) myélinisés montrant de nombreux neurofilaments et quelques microtubules (flèches). Clichés Labo BC4 et Labo. BG, Orsay.

nique quand il s'agit d'étudier des structures à grande échelle. C'est le cas ici, car nous avons affaire à des structures tubulaires ou fibreuses, organisées le plus souvent en édifices de grande taille emplissant toute la cellule. La finesse extrême des coupes utilisées dans cette approche conduit à une vision très partielle des objets, faisant alors perdre la notion de volume. Ainsi, bien que toutes les structures cytosquelettiques élémentaires fussent connues dans le plus grand détail dès le début des années 70, la notion de cytosquelette elle-même n'était pas encore établie. Il fallut attendre le perfectionnement d'une technique déjà ancienne : l'immunofluorescence, et la purification des molécules constitutives du cytosquelette, grâce aux techniques biochimiques, pour que les observations permettent de dégager ce nouveau concept, vers la fin de la décennie. Celui-ci a totalement renouvelé, voire révolutionné, notre façon de comprendre la cellule eucaryotique.

1.2. Données de la microscopie photonique

1.2.1. Immunofluorescence indirecte et microscopie confocale

L'immunofluorescence implique que les protéines majeures constituant les structures à observer aient préalablement été purifiées par les techniques biochimiques ; la tubuline, l'actine et les protéines des microfilaments, qui sont à la base des réseaux décrits plus haut, seront étudiées en détail dans les lignes suivantes. L'**immunofluorescence indirecte** dérive de la technique d'immunofluorescence directe décrite dans le chapitre 3.

Cette méthode est basée sur le principe suivant : l'anticorps primaire fabriqué contre la molécule que l'on cherche à visualiser n'est pas lui-même rendu fluorescent par couplage à un fluorochrome ; il est en fait reconnu par un deuxième type d'anticorps, dit secondaire, fabriqué «contre» le premier. Les immunoglobulines d'un Mammifère comme la souris sont reconnues comme des antigènes par un autre Mammifère tel que le lapin, par exemple, contre lesquels celui-ci fabrique des anticorps anti-immunoglobulines de souris. Ce sont ces dernières molécules purifiées qui seront marquées et détectées au microscope. Le protocole est le suivant : l'anticorps primaire est lié à sa cible et l'anticorps secondaire fluorescent est ensuite accroché à lui ; comme toutes les reconnaissances sont très spécifiques au sein de cet édifice, la fluorescence est émise au niveau de la cible primaire seule (voir *figure* 11.4). Les avantages de la technique sont considérables : 1) on amplifie beaucoup le signal émis car plusieurs molécules d'anticorps secondaires sont fixées sur une seule molécule d'anticorps primaire, 2) les anticorps primaires sont rares et précieux, car ils résultent souvent de longues et coûteuses expériences, tandis que les anticorps secondaires sont vendus dans le commerce, déjà couplés à des fluorochromes. Cette technique est donc plus sensible que la précédente et n'exige que de faibles quantités d'anticorps primaires.

Son apport est capital dans l'analyse du cytosquelette car, appliquée à des cellules entières, elle permet de visualiser les réseaux en trois dimen-

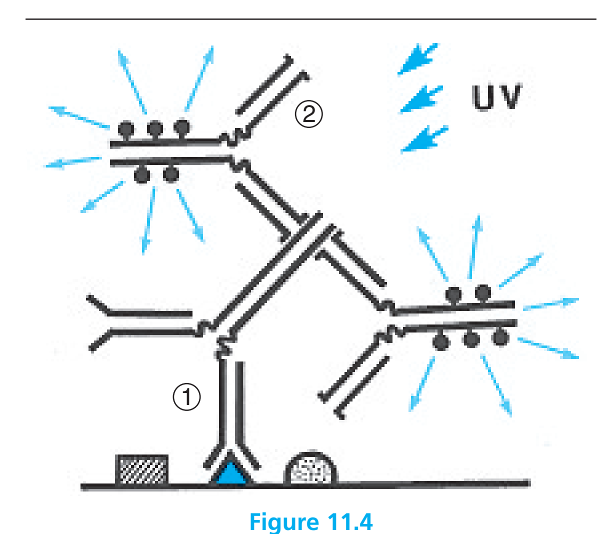


Figure 11.4

Principe de l'immunofluorescence indirecte

Comparer ce schéma à celui de la *figure* 3.8, présentant l'immunofluorescence directe.
(1) Anticorps primaire ; **(2)** Anticorps secondaire.

sions. De plus, grâce à l'utilisation simultanée d'anticorps distincts marqués par des fluorochromes différents, elle permet d'étudier les interrelations existant entre eux ou bien avec d'autres structures ou organites. Depuis 1987, cette approche s'est enrichie d'une nouvelle technique cytologique, nommée **microscopie confocale**, qui fournit des images d'une qualité exceptionnelle. Celle-ci a connu un développement fulgurant car elle complète remarquablement l'utilisation des marqueurs fluorescents couplés aux protéines. Son principe est exposé dans l'encart suivant.

1.2.2. Différents réseaux et structures visualisés

• Lorsque des **anticorps anti-tubuline** sont appliqués à des cellules animales en culture fixées et perméabilisées, on obtient des images telles que celle de la *figure* 11.5. Le cytoplasme de ces cellules est sillonné par une multitude de filaments lumineux, plus ou moins tortueux, représentant des microtubules individuels ou très proches ; ceux-ci sont particulièrement abondants à proximité du noyau, qui se détache en sombre sur le cliché. Cet aspect tient à deux raisons : d'une part, ces cellules sont très aplaties sur leur support et la masse de hyaloplasme contenant les microtubules est plus abondante autour du noyau qu'à son niveau, d'autre part c'est à proximité de ce dernier que se situe l'unique **foyer de nucléation** de microtubules présent dans ce type de cellules. On désigne, par cette expression, toute structure capable de provoquer l'apparition (amorcer la synthèse) de nouveaux microtubules ; dans le cas présent, cette structure est constituée par le centrosome, dont l'organisation précise sera décrite plus tard.

La même technique, appliquée à des cellules végétales différenciées telles que des cellules de parenchyme foliaire, montre que les microtubules se disposent en faisceaux corticaux parallèles et serrés qui forment une hélice tournant tout autour de la cellule. L'orientation de ces faisceaux est, comme on l'a signalé plus haut, parallèle à celle des fibres de cellulose de la paroi. Enfin, lorsqu'on

Encart technique

Le microscope confocal

Dans un microscope photonique banal, la lumière traverse complètement l'objet observé et chaque plan illuminé de celui-ci interfère, au niveau du signal reçu par l'œil, avec tous ceux situés au-dessus et au-dessous ; quand il s'agit d'objets d'épaisseur supérieure à 5 µm, ceci conduit à un brouillage important de l'image. Le microscope confocal comporte un dispositif d'éclairage par un fin faisceau laser focalisé, à travers l'objectif, sur un seul point de l'objet. Ce point, vivement éclairé, réémet une lumière qui traverse à son tour l'objectif et est captée par un système de photomultiplicateurs ; ceux-ci amplifient le signal qui est enregistré sur un système vidéo. L'utilisation d'un diaphragme très fin à l'entrée des photomultiplicateurs permet de ne capter que les rayons lumineux provenant du seul point éclairé de l'objet. Le faisceau, qui a donc la forme d'un cône lumineux très pointu, balaie le plan de l'objet point par point et procède par plans successifs distants de 0,1 à 1 µm dans le sens de l'épaisseur de l'objet. L'avantage considérable de ce système est qu'il permet de réaliser artificiellement des coupes optiques et d'étudier des objets transparents épais, en les analysant optiquement plan après plan. Son association avec des systèmes informatiques sophistiqués permet d'exploiter de façon très complète les images enregistrées : analyses quantitatives, stéréoscopie, reconstitutions en trois dimensions, fausses couleurs.

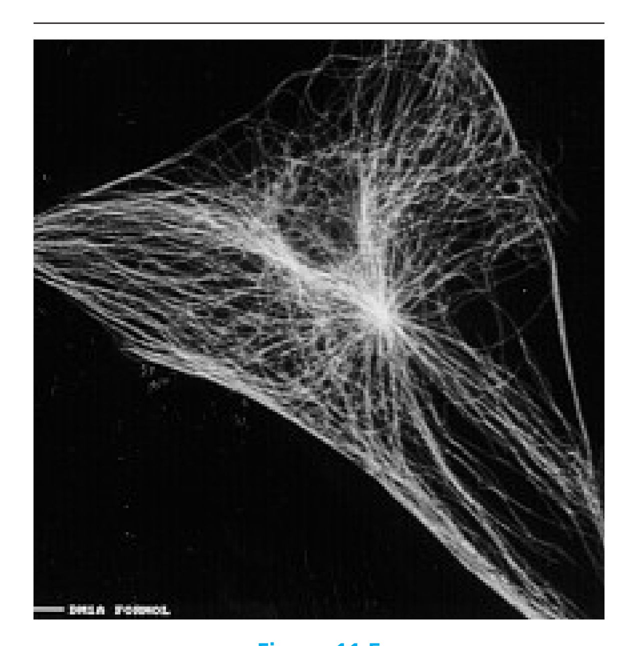


Figure 11.5

Réseau microtubulaire d'une cellule animale en culture observé en immunofluorescence

Le centrosome est le point brillant, situé près du noyau (qui apparaît en sombre), d'où partent tous les microtubules qui sillonnent la cellule : c'est le centre organisateur. Cliché A. Fleury, Labo. BC4, Orsay.

examine des Protistes du groupe des Ciliés, on est frappé par la richesse de leur cytoplasme en structures construites à partir de microtubules ; nous illustrerons ce point dans le paragraphe 3.2.

• Lorsque des fibroblastes en culture sont traités par des **anticorps anti-actine**, les images obtenues diffèrent radicalement de celles décrites pour la tubuline : de longs câbles épais à localisation corticale, parfois entrecroisés, sont tendus d'un bout à l'autre de la cellule (voir *figure* 11.6). Ces câbles formés de microfilaments sont parfois nommés **fibres toniques** (ou **fibres de tension**) en raison de leur aspect rigide ; ils convergent vers des points, nommés **points de contact focaux** (ou **plaques d'adhérence**) rassemblés essentiellement dans les prolongements cellulaires. Ces derniers constituent des dispositifs transmembranaires servant à ancrer la cellule sur son support et à la maintenir aplatie ; ils rapprochent en fait les câbles tendus dans la cellule de certaines zones de la matrice extracellulaire avec lesquelles celle-ci entre en contact étroit (voir chapitre 14). En revanche, dans certains territoires cellulaires, en particulier au niveau des prolongements aplatis ayant un aspect de pseudopode, et appelés **lamellipodes**, qui sont abondants dans les cellules se déplaçant sur leur support, la fluorescence liée à l'actine apparaît diffuse. Ceci tient au fait, comme le montre la cytologie électronique, que les microfilaments d'actine n'ont pas à ce niveau une orientation particulière (voir *figure* 11.2b). Ce type d'observation est également classique dans les cônes de croissance des axones en culture.

• Enfin, l'observation en immunofluorescence de cellules épithéliales en culture marquées par un **anticorps anti-filaments intermédiaires** (anti-kératine, par exemple) montre un aspect rappelant celui décrit pour les microtubules : des filaments tortueux, abondants à proximité du noyau, sillonnent le cytoplasme. Des expériences de double marquage : anti-tubuline et anti-kératine, montrent que ces deux réseaux sont partiellement superposables, suggérant que des interactions existent entre eux ; ce point sera discuté plus loin. Lorsque ces cellules en culture sont jointives sur leur support, on observe aussi que certains faisceaux de ces filaments sont en parfaite continuité d'une cellule à l'autre, bien que celles-ci soient distinctes et séparées par leurs membranes plasmiques. Ceci s'explique par le fait que ces faisceaux convergent vers des points communs aux deux cellules appelés **desmosomes**, qui sont des structures transmembranaires appartenant à la famille des jonctions intercellulaires (voir chapitre 14).

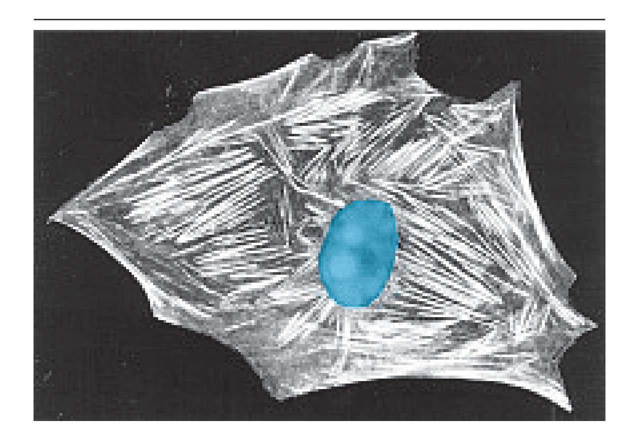


Figure 11.6

Réseau de microfilaments d'une cellule animale en culture observé en immunofluorescence

De nombreux câbles épais s'entrecroisent au sein du cytoplasme ; la périphérie de la cellule contient en revanche de l'actine non polymérisée en câbles (fluorescence diffuse). Le noyau central est coloré par un fluorochrome spécifique de l'ADN (DAPI) ; d'après un cliché de E. Lazarides.

2. CONSTITUTION CHIMIQUE ET ORGANISATION MOLÉCULAIRE DES ÉLÉMENTS DU CYTOSQUELETTE

2.1. Tubuline et microtubules

Le constituant majoritaire des microtubules est une protéine globulaire nommée **tubuline**. Celle-ci est purifiée à partir de cellules ou de structures riches en microtubules, telles que le cerveau des Vertébrés supérieurs (où elle représente 10 à 20 % des protéines totales), ou les fuseaux mitotiques des cellules embryonnaires en division rapide. On l'extrait aussi à partir des cils (Protistes Ciliés : *Paramecium*, ou cellules ciliées de certains Mollusques : branchies des Moules) ou bien à partir des flagelles de spermatozoïdes de divers Animaux (Oursins) ou d'Algues unicellulaires (*Chlamydomonas*). En effet, certains traitements chimiques ou des traitements mécaniques un peu violents entraînent leur cassure et leur détachement des corps cellulaires. Par centrifugation à faible vitesse, il est possible d'éliminer ces derniers sous forme d'un culot et d'obtenir dans le surnageant une fraction pure de cils ou de flagelles, centrifugeables à leur tour.

2.1.1. MONOMÈRES ET DIMÈRES αβ

L'extraction des protéines de microtubules et leur analyse par ultracentrifugation ou électrophorèse dénaturante montrent l'existence d'un composant majoritaire ayant une masse moléculaire voisine de 50 kDa. En fait, ce composant se résout en deux polypeptides de taille très voisine, présents en quantité équimoléculaire, parfois difficilement séparables, et nommés tubulines α et β. Ces deux polypeptides existent toujours à l'état natif sous la forme de dimères αβ, qui constituent les unités globulaires des protofilaments. Les deux sous-unités sont liées par des liaisons faibles (structure de type quaternaire), et on parle donc d'**hétérodimères αβ** (100 kDa).

Les tubulines possèdent la caractéristique remarquable d'être extrêmement conservées au plan évolutif : quelle que soit l'origine des microtubules, Protistes, Invertébrés, Vertébrés, Végétaux inférieurs ou supérieurs, les séquences d'acides aminés des deux types de polypeptides sont en effet très proches, ne différant que par quelques unités sur les 450 environ qui les constituent. Cette universalité des séquences ne fait, somme toute, que refléter la constance de la structure des microtubules chez tous les Eucaryotes.

2.1.2. AUTOASSEMBLAGE EN PROTOFILAMENTS ET POLYMÉRISATION DES MICROTUBULES

La propriété majeure de la tubuline purifiée en solution est sa possibilité de s'associer spontanément en édifices d'ordre supérieur de grande taille, conduisant à former des microtubules ; on parle d'**autoassemblage** (voir chapitre 1). Le premier niveau d'assemblage est le protofilament, qui résulte de l'alignement régulier des dimères αβ s'accrochant les uns aux autres par une extrémité complémentaire, toujours au moyen de liaisons faibles (voir *figure* 11.7). Plusieurs courts protofilaments de ce type peuvent se placer côte à côte et constituer un microtubule incomplet et à paroi aplatie ; lorsque treize protofilaments se sont ainsi associés, le tube se ferme et on obtient un fragment

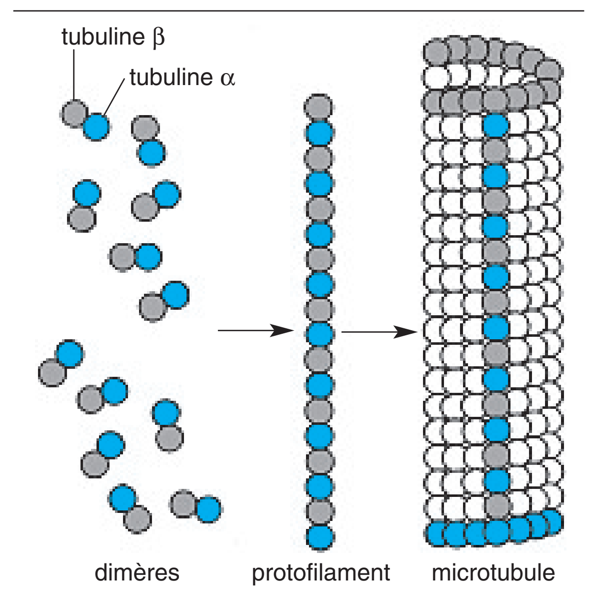


Figure 11.7
Organisation moléculaire des microtubules
Un protofilament est une structure polarisée car une de ses extrémités est constituée par une sous-unité α et l'autre par une sous-unité β. Les protofilaments se disposent parallèlement les uns aux autres, avec la même orientation, pour former les microtubules ; il s'en suit que ces derniers sont eux aussi polarisés. Les protofilaments voisins sont légèrement décalés les uns par rapport aux autres.

de microtubule. Ce dernier sert alors directement de germe de polymérisation (ou amorce) en accrochant de nouveaux dimères à ses deux extrémités.

Ce phénomène de polymérisation spontanée *in vitro* est d'abord fonction de la concentration en tubuline dans la solution ; il se produit seulement si un seuil critique de concentration est dépassé, à la manière d'un processus de cristallisation. On observe le phénomène inverse de dépolymérisation de microtubules constitués si la concentration en dimères est diminuée par simple dilution, par exemple : il s'agit donc d'un équilibre établi entre dimères et édifices d'ordre supérieur. D'autres facteurs influent sur ces processus, tels que les basses températures (inférieures à 4°C), les hautes pressions (supérieures à 250 kg/cm^2), ou certains composés chimiques qui sont connus pour être des agents dépolymérisants, *in vivo* comme *in vitro*. La notion de microtubule labile signalée plus haut découle de ces observations.

2.1.3. Propriétés dynamiques des microtubules *in vitro* et *in vivo*

La vitesse de polymérisation *in vitro* des microtubules est stimulée par le nucléoside triphosphate GTP, qui leur confère en outre des propriétés particulières à cet égard. En sa présence, les deux extrémités des amorces de microtubules utilisées *in vitro* ne manifestent pas les mêmes caractéristiques de polymérisation (seuil de concentration critique et vitesse d'allongement). Le GTP se lie à la tubuline libre et forme un complexe qui se fixe préférentiellement à une des deux extrémités du microtubule, en raison de sa polarité structurale : bien que la polymérisation de la tubuline ait simultanément lieu aux deux extrémités et soit un phénomène réversible, l'une des deux s'allonge globalement plus vite que l'autre. De même, dans les conditions de faible concentration en tubuline libre qui favorisent la dépolymérisation, on montre qu'une des deux extrémités du microtubule se raccourcit plus vite que l'autre. Il existe une concentration remarquable *in vitro* pour laquelle une extrémité s'allonge et l'autre se raccourcit, et ce, à la même vitesse. Si l'on admet que le microtubule peut être «posé» sur un support, ce phénomène conduit à son déplacement net, sans modification de longueur (l'hydrolyse du GTP constitue la source d'énergie du processus). On parle de mécanisme de **tapis roulant** pour décrire ceci et on est amené à définir une extrémité (+) et une extrémité (–) au microtubule.

Bien que ce phénomène ait été invoqué pour expliquer les propriétés dynamiques des microtubules dans la cellule animale, il semble cependant acquis qu'il ne peut se produire *in vivo*. La cytologie montre en effet que la plupart de ces derniers sont ancrés par une de leurs extrémités au niveau de structures stables qui font office de centres organisateurs ; cette extrémité bloquée est notée (–). Le modèle de la dynamique des microtubules *in vivo* est, schématiquement, le suivant : seule l'extrémité libre (+) est capable de se polymériser et de se dépolymériser réversiblement ; l'allongement a lieu de façon lente à partir des dimères libres de tubuline-GTP du cytoplasme et, en fonction de leur concentration locale au niveau de cette extrémité, la polymérisation se poursuit ou pas. En dessous d'un certain seuil, la polymérisation cesse et entraîne la dépolymérisation très rapide de tout le microtubule ; la libération simultanée de dimères de tubuline-GDP permet à d'autres microtubules de s'allonger (après transformation en tubuline-GTP). On parle d'**instabilité dynamique**.

Les observations les plus récentes, effectuées *in vivo* sur des microtubules individuels marqués par de la tubuline fluorescente injectée, au moyen de systèmes de vidéo-amplification, confirment le modèle et conduisent à se représenter les choses de la manière suivante : à partir du foyer de nucléation que constitue le **centrosome** (voir plus loin), il faut imaginer à tout instant un «foisonnement» de microtubules dont certains s'allongent lentement (1 µm/min) tandis que d'autres se raccourcissent à grande vitesse (7 µm/min). La notion de microtubules labiles, évoquée plus haut, prend alors tout son sens.

2.1.4. Drogues perturbant le cytosquelette microtubulaire

Diverses substances à propriétés pharmacologiques, tirées de plantes réputées vénéneuses et connues depuis fort longtemps, interfèrent avec les microtubules dynamiques des cellules. La **colchicine**, alcaloïde extrait du colchique, entraîne l'arrêt de la mitose dans les cellules en prolifération ; en se liant aux dimères de tubuline en solution, elle les empêche de participer à toute nouvelle polymérisation de microtubules. Comme cette fixation n'interfère pas avec la dépolymérisation,

les microtubules qui disparaisssent ne sont pas renouvelés, ce qui conduit rapidement, par exemple, à la disparition des asters et du fuseau de division dans les cellules animales en mitose (voir chapitre 12). La **vinblastine**, alcaloïde extrait d'une pervenche, provoque l'association de la tubuline cytoplasmique libre en gros cristaux à motif hexagonal ; en immobilisant la tubuline sous une forme insoluble, son effet est semblable à celui de la colchicine.

En revanche, le **taxol** est une substance toxique extraite de l'écorce ou des feuilles de l'if (conifère ornemental) dont les propriétés sont inverses de celles des deux composés précédents ; il empêche les microtubules de se dépolymériser en formant un manchon autour d'eux, et ainsi les stabilise.

ENCART BIOMÉDICAL

Les substances antimitotiques

Malgré ces différences au niveau de leur mode d'action, toutes ces substances, ainsi que leurs dérivés modifiés chimiquement, ont le même effet : le blocage réversible de la division cellulaire. Elles constituent donc des **antimitotiques** puissants. Elles sont, à ce titre, utilisées comme des médicaments anticancéreux (chimiothérapie) car elles ont pour cible privilégiée les cellules tumorales à division rapide, ainsi d'ailleurs que toutes les cellules-souches à division continue dans notre organisme, d'où leurs effets secondaires (voir chapitre 12). La colchicine est de plus connue depuis l'antiquité comme agent efficace dans le traitement des crises de goutte ; elle agit en fait en empêchant les globules blancs mobiles d'atteindre les articulations et a donc une action anti-inflammatoire.

2.1.5. Les protéines associées aux microtubules et leurs fonctions

La purification des tubulines se réalise en général grâce à une succession de cycles de dépolymérisation et de polymérisation *in vitro* ; ceci permet en effet d'éliminer par étapes (au moyen de centrifugations appropriées), toutes les protéines ne formant pas de microtubules. Cependant, au cours de ces protocoles, on observe (par électrophorèse, par exemple) que plusieurs espèces protéiques copurifient de façon systématique avec la tubuline, comme si elles présentaient une forte affinité pour celle-ci. De fait, on montre qu'un certain nombre de protéines sont, *in vivo*, étroitement associées aux microtubules, dont elles modifient les propriétés et auxquels elles confèrent une grande diversité de fonctions. Ces molécules, nommées **MAPs** (*microtubule associated proteins*), interviennent soit pour stabiliser les microtubules, soit pour les organiser en édifices complexes, comme les centrioles ou les axonèmes, soit pour leur permettre de s'associer à d'autres constituants cellulaires.

Deux classes principales de ces protéines existent dans le cerveau, l'une de masse moléculaire très élevée (250 kDa), dont on a montré qu'elle forme de longs bras latéraux régulièrement espacés le long des microtubules, l'autre de plus petite taille (40 à 60 kDa), qui se fixe aussi sur toute leur longueur. Les fonctions exactes de beaucoup de ces molécules restent encore mal connues ; nous décrirons plus loin divers représentants de cette famille, associés au déplacement des microtubules les uns par rapport aux autres, ou à celui d'organites et de vésicules.

2.2. Actine et microfilaments

2.2.1. Monomères

Le constituant élémentaire des **microfilaments** est une protéine globulaire nommée **actine** ; celle-ci est connue depuis longtemps en tant que protéine majeure des fibres musculaires striées, au même titre que la myosine. L'actine est cependant présente dans toutes les cellules eucaryotiques banales ou différenciées, animales ou végétales (où elle représente jusqu'à 10 % de la masse des protéines totales), ainsi que chez divers Protistes. De nombreux points communs existent entre les propriétés de cette molécule et celles de la tubuline, en ce qui concerne leur capacité à former par auto-assemblage des structures d'ordre supérieur, linéaires et de grande taille.

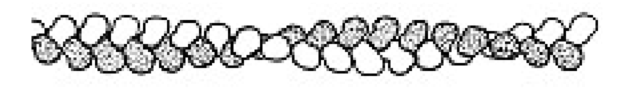
Le monomère d'actine, ou actine G (globulaire), est un polypeptide de 42 kDa (375 acides aminés), lorsqu'il est extrait du muscle squelettique des Vertébrés ; les données cytologiques les plus récentes suggèrent que sa morphologie est celle d'un haltère à barre très courte. Cette molécule est évolutivement très conservée et ne diffère, par exemple, que de quelques acides aminés entre les

Vertébrés et les Champignons ; comme pour la tubuline, cette conservation témoigne des contraintes fortes qui président à la constuction des microfilaments. Chez les organismes complexes il existe, dans les différents tissus d'un même individu, plusieurs formes très voisines de cette molécule ; celles-ci sont codées par une famille de gènes répétés, descendant par duplication d'un gène ancestral. On compte, par exemple, au moins six formes d'actine distinctes chez les Oiseaux et les Mammifères, et chez certains Végétaux supérieurs, plus de 60 gènes ont été identifiés.

2.2.2. Autoassemblage des microfilaments. Propriétés dynamiques

De même que la tubuline, l'actine purifiée en solution est spontanément capable de s'associer pour former de longs filaments de plusieurs centaines de monomères : l'actine F ou fibreuse (voir *figure* 11.8). Les microfilaments sont structuralement polarisés et possèdent une extrémité dite (+) et un extrémité dite (–) (voir plus loin). Les paramètres qui conditionnent l'autoassemblage *in vitro* sont ici aussi :

– la concentration en monomère : au-delà d'un seuil critique, l'assemblage a lieu à partir de la solution, en deçà des microfilaments constitués se dépolymérisent ;
– la présence d'un nucléotide triphosphate : l'ATP, qui se fixe sur les monomères et est ici responsable des propriétés différentes des deux extrémités par rapport aux vitesses d'assemblage et de désassemblage du filament.



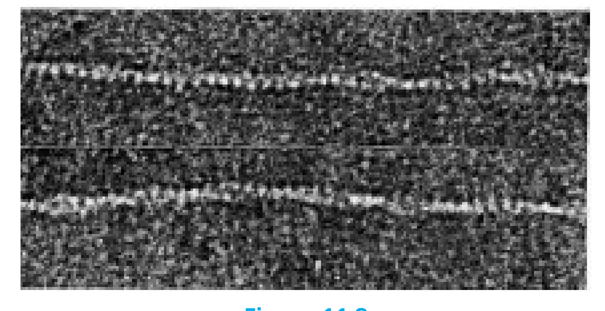


Figure 11.8

Organisation moléculaire des microfilaments

Les monomères d'actine en forme de court haltère s'organisent pour former une structure linéaire hélicoïdale dont la périodicité est de 37 nm.

Ces phénomènes sont tout à fait semblables à ceux déjà décrits pour la tubuline. Le mécanisme de tapis roulant qui a été présenté plus haut fonctionne aussi *in vitro* pour l'actine, l'extrémité (+) étant celle qui s'allonge tandis que celle qui se raccourcit à la même vitesse est notée (–). Cependant, à la différence des microtubules qui nécessitent un centre organisateur pour pouvoir être nucléés et qui ont toujours une extrémité bloquée (–) *in vivo*, le phénomène de tapis roulant (qui implique que les deux extrémités soient libres) fonctionne ici très certainement dans les cellules vivantes. Bien que les microfilaments puissent ainsi apparaître spontanément dans le hyaloplasme, nous verrons plus loin que la membrane plasmique semble parfois agir comme un lieu privilégié de nucléation.

Les propriétés dynamiques de ces structures sont évidemment à l'origine de différents types de mouvements à l'intérieur des cellules, ou des cellules elles-mêmes, mais on trouve aussi des microfilaments d'actine dans des édifices très stables, typiques de nombreuses cellules animales différenciées. Diverses drogues qui perturbent l'autoassemblage des microfilaments sont connues ; deux d'entre elles seront signalées dans le paragraphe 3.5.3.

2.2.3. Les protéines associées aux microfilaments et leurs fonctions

Comme on l'a vu pour les microtubules, il existe un grand nombre de protéines qui s'associent aux microfilaments, modifient leurs propriétés et leur permettent d'assurer des fonctions diversifiées, voire opposées. Il faut bien comprendre que des microfilaments nus et libres dans le hyaloplasme ne pourraient y accomplir aucune activité. Plusieurs dizaines de protéines de ce type sont connues, dont certaines sont générales et communes à toutes les cellules, tandis que d'autres sont spécifiques de types cellulaires différenciés (voir *figure* 11.9). Les principales familles de protéines de liaison sont les suivantes :

– les **protéines de réticulation ou de rassemblement** : ces molécules associent les microfilaments les uns aux autres pour donner des gels tridimensionnels (filamine) ou bien pour former des faisceaux ou des câbles plus ou moins serrés, selon leur taille (α actinine, fimbrine, villine) ;
– les **protéines de stabilisation ou de fragmentation** : les premières protègent et consolident les microfilaments en formant un manchon autour

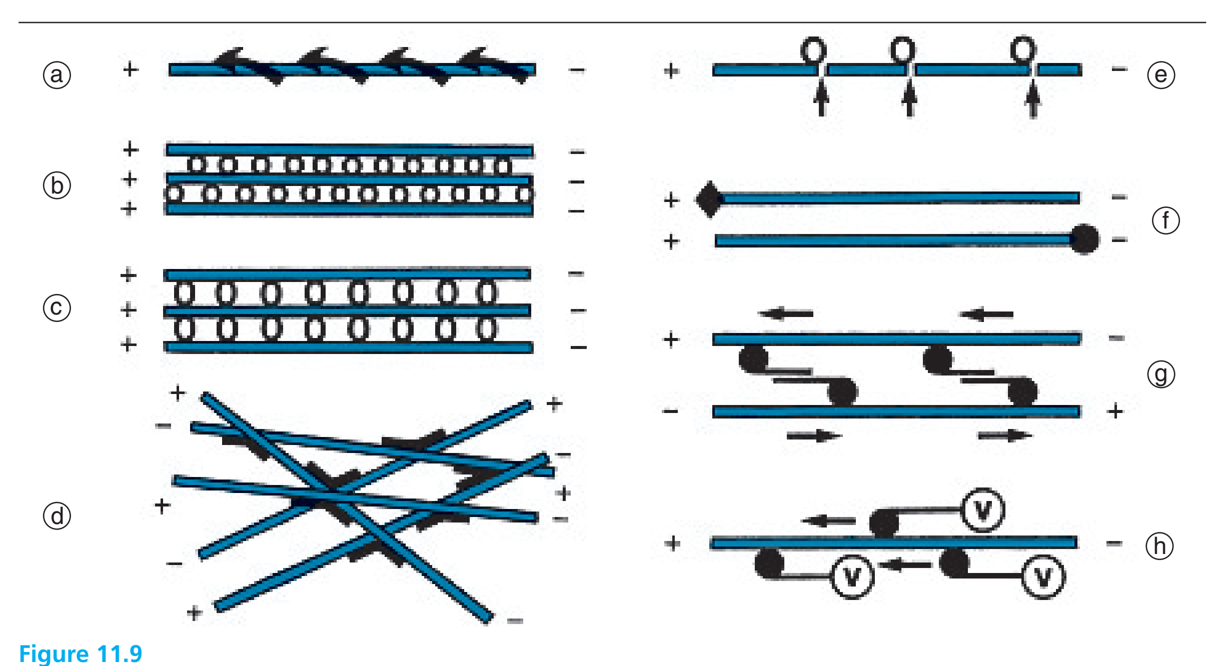


Figure 11.9

Mode d'action de quelques protéines de liaison à l'actine

On donne les exemples des protéines : **(a)** de consolidation ; **(b)** et **(c)** de formation de faisceaux plus ou moins serrés ; **(d)** de réticulation ; **(e)** de déstabilisation ; **(f)** de coiffage d'une extrémité ; **(g)** de glissement ; **(h)** de transport de vésicules (V).

d'eux (tropomyosine) ; les secondes, au contraire, les fragmentent en courts morceaux lorsqu'elles se collent sur leurs flancs (gelsoline) ;

– les **protéines de coiffage** : elles se fixent aux extrémités des microfilaments et les empêchent ainsi soit de se polymériser, soit de se dépolymériser. Certaines d'entre elles ancrent, par exemple, les microfilaments à la membrane plasmique, par leur extrémité +, au niveau des points de contact focaux (vinculine, voir *figure* 14.17) ;

– les protéines de type **myosine** (des cellules musculaires striées, des fibres lisses ou des cellules banales) : elles ont la propriété de s'associer à l'actine pour former des systèmes contractiles par glissement des deux types de filaments les uns par rapport aux autres (dans les sarcomères, par exemple). La **minimyosine** est un type très particulier de myosine qui s'associe aux membranes cellulaires (vésicules, membrane plasmique) et permet leur déplacement sur des rails d'actine (voir plus loin) ;

– les **protéines d'accrochage aux membranes**, comme la taline.

Toutes ces protéines qui contrôlent l'association, l'allongement, le glissement…, des microfilaments sont elles-mêmes sous la dépendance d'autres facteurs tels que le pH ou les ions Ca^{2+}, de sorte que la coordination des fonctions assurées par les structures impliquant l'actine est d'une très grande complexité. Nous reparlerons de ces molécules lors de l'étude des fonctions du cytosquelette.

2.3. Protéines constitutives des filaments intermédiaires

Les réseaux de filaments intermédiaires, spécifiques des cellules animales, présentent de grandes différences, au plan moléculaire, avec ceux constitués par les microtubules et les microfilaments :

– ils sont formés de monomères qui sont des molécules fibreuses et non globulaires ;

– les molécules élémentaires sont spécifiques de types cellulaires particuliers ;

– les structures d'ordre supérieur, c'est-à-dire les filaments eux-mêmes, sont chimiquement et structuralement très stables et ne présentent pas les aspects dynamiques décrits pour les deux autres réseaux. Leur autoassemblage ne nécessite aucun apport d'énergie chimique.

2.3.1. Diversité des protéines constitutives et spécificité tissulaire

On distingue six grands groupes de monomères présentant une plus ou moins grande spécificité tissulaire :

– les **kératines** (40 à 70 kDa), parmi lesquelles on distingue les «acides» et les «neutres-basiques» ; elles sont spécifiques des cellules épithéliales et des dérivés épidermiques (phanères) chez les Vertébrés ;
– la **vimentine** (55 kDa), spécifique des cellules d'origine mésenchymateuse : fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales ;
– la **desmine** (53 kDa), spécifique des cellules musculaires lisses, cardiaques ou striées ;
– les **protéines des neurofilaments**, au nombre de 3 (70, 150 et 210 kDa), spécifiques des neurones ;
– la **protéine** dite **fibrillaire gliale acide** (48 kDa), spécifique de certaines cellules gliales du système nerveux ;
– les **lamines nucléaires**, au nombre de 3 (65-70 kDa), que l'on trouve dans la lamina du noyau de toutes les cellules animales.

L'organisation moléculaire de ces différents monomères est commune à toutes les familles citées : ce sont des protéines fibreuses, linéaires, possédant une zone centrale de 40 à 50 nm de long organisée en hélice α rigide. Les domaines N et C terminaux sont de taille variable suivant le type et ils sont organisés de façon plus ou moins globulaire. Certains types cellulaires peuvent exprimer en même temps deux familles de protéines de filaments intermédiaires : kératine et vimentine (cas de quelques cellules épithéliales en culture ; voir plus loin), ou bien desmine et vimentine.

2.3.2. Autoassemblage des filaments intermédiaires

Les monomères s'assemblent en dimères hélicoïdaux parallèles (extrémités N et C du même côté), puis en tétramères antiparallèles de 70 nm de long, en se disposant parallèlement les uns aux autres, de façon légèrement décalée. Ces tétramères se mettent ensuite bout à bout pour former un protofilament ; enfin, huit protofilaments disposés eux-mêmes de manière parallèle, forment un filament intermédiaire dont le diamètre varie suivant la nature du monomère fibreux de base. Cette disposition à base de tétramères antiparallèles fait qu'un protofilament n'est pas polarisé, contrairement aux structures construites à base de tubuline ou d'actine (voir *figure* 11.10). Le rapprochement des monomères et la stabilisation de cet édifice supramoléculaire, qui ressemble à un cordage serré, ne mettent jeu que des liaisons non covalentes, faibles mais très nombreuses. Les kératines forment des protofilaments qui utilisent toujours deux sortes différentes de molécules de base (acides et neutres-basiques) : on parle d'hétéropolymères ; par contre, les autres protéines des filaments intermédiaires peuvent former des homopolymères, en utilisant un seul type de monomère. Lorsqu'une cellule exprime à la fois des kératines et des protéines de type vimentine ou desmine, les deux réseaux de filaments obtenus sont bien distincts, tout en ayant une répartition voisine.

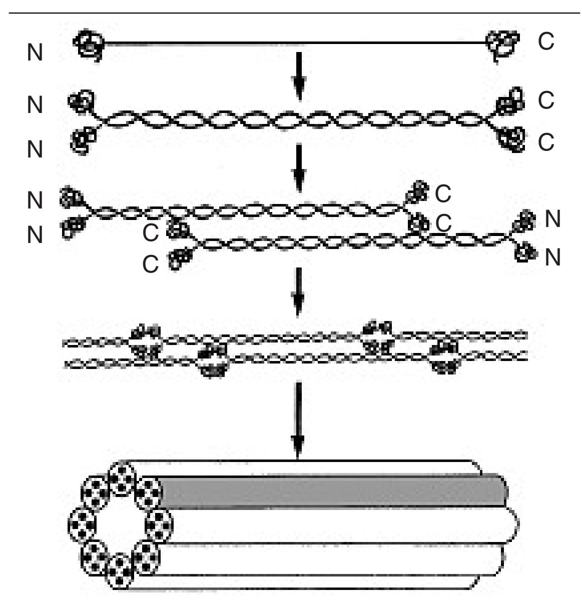


Figure 11.10

Organisation moléculaire des filaments intermédaires

Les monomères sont des molécules fibreuses portant des extrémités N et C globulaires ; ils s'associent pour former des dimères, en respectant la même polarité. Dans les tétramères, les dimères sont légèrement décalés et leurs polarités sont opposées. Les tétramères s'alignent parallèlement les uns aux autres, pour former des fibres de 10 nm de diamètre environ, contenant 8 câbles élémentaires de tétramères.

2.3.3. Stabilité des filaments intermédiaires

Dans certains types de cellules en culture interphasiques, on montre que le tracé des filaments intermédiaires de vimentine ou de kératine est pratiquement superposable à celui des microtu-

bules, ce qui suggère un lien entre les deux et une mise en place coordonnée. Cependant, les traitements ou drogues qui dépolymérisent totalement le cytosquelette microtubulaire labile n'affectent que peu les premiers, bien qu'ils subissent une certaine réorganisation. De même, pendant la mitose, alors que tous les microtubules cellulaires se sont réorganisés et sont momentanément impliqués dans la construction des asters et du fuseau, les filaments intermédiaires persistent en formant une cage autour de celui-ci. On ne connaît pas de drogue ou d'agent physique susceptible de dépolymériser *in vivo* ou *in vitro* les filaments intermédiaires. Nous verrons plus loin que ces derniers peuvent contribuer à former des édifices de grande dimension, d'une résistance mécanique élevée et d'une stabilité chimique à toute épreuve, en particulier ceux formés de kératines chez les Vertébrés. Dans ce cas, les liaisons faibles qui organisent essentiellement ces édifices sont renforcées par des liaisons covalentes entre monomères.

3. FONCTIONS DU CYTOSQUELETTE ET DES STRUCTURES ASSOCIÉES

3.1. Structures stables et instables. Notion de centre organisateur

Les réseaux du cytosquelette des cellules animales, ainsi que les structures spécialisées constituées des mêmes éléments, remplissent un grand nombre de fonctions qui se résument en trois catégories : 1) l'architecture interne et la forme cellulaire, 2) la dynamique interne, et 3) les mouvements cellulaires. Ces fonctions apparemment contradictoires peuvent cependant être assurées par des éléments d'un même réseau ; on rencontre, par exemple, des microtubules et des microfilaments à la fois dans des édifices stables ou d'autres qui sont très dynamiques. Cette dualité est liée à la présence de protéines associées qui modulent l'activité des éléments structuraux de base. En revanche, les fonctions des réseaux de filaments intermédiaires sont toujours de type architectural.

In vivo, la polymérisation des microtubules met en jeu des hétérodimères $\alpha\beta$ présents dans le hyaloplasme, mais elle ne se fait pas de manière bidirectionnelle, contrairement à ce qui se passe *in vitro*. Elle a lieu dans des régions bien spécifiques qui servent d'amorces et initient un processus de polymérisation orientée : on parle alors de **centres organisateurs** ; il s'agit essentiellement des centrosomes et des corpuscules basaux des cils, dont les mécanismes d'initiation sont très différents. Une tubuline particulière, peu abondante, a été mise en évidence au sein de ces structures : la tubuline γ. Son rôle dans la nucléation des microtubules a été démontré aussi bien *in vitro* que *in vivo*, sous la forme de complexes en anneau (rassemblant 10 à 15 molécules) qui se lient aux dimères $\alpha\beta$. Au sein des cellules, il semble donc que les microtubules aient toujours une extrémité (–) bloquée. De même, nous verrons que certains points de la membrane plasmique (points de contact focaux), fonctionnent sans doute comme des centres organisateurs pour les microfilaments, au niveau de leur extrémité (+), dans les cellules en mouvement.

3.2. Utilisation des anticorps monoclonaux pour l'étude du cytosquelette

Une approche très efficace de l'organisation et des rapports structure/fonction au sein du cytosquelette consiste à construire une collection d'anticorps spécifiques dirigés contre tous les polypeptides caractéristiques des structures étudiées ; il s'agit de la technique dite des **anticorps monoclonaux** (voir encart suivant). Celle-ci constitue un développement de la méthode classique d'obtention des **anticorps polyclonaux**, dont nous rappelons les principales lignes. Lorsqu'un antigène donné (protéine, polysaccharide…) est injecté de façon répétée chez une souris, un lapin ou une chèvre, des anticorps sont obtenus contre celui-ci ; ils constituent un mélange hétérogène de molécules (anticorps polyclonal), car plusieurs sortes de lymphocytes B, produisant chacun un seul type d'anticorps, ont été stimulées chez l'animal par des épitopes différents du même antigène et ont été à l'origine d'un clone. Un anticorps monoclonal est défini comme la population homogène de molécules sécrétées par un clone de lymphocytes B donné. Ces lymphocytes normaux ne poussent pas indéfiniment en culture et, de toute manière, il est impossible de les séparer les uns des autres à partir du sang prélevé chez l'animal pour obtenir éventuellement un anticorps pur.

De façon générale, les anticorps servent de sonde pour localiser un antigène donné dans des

ENCART TECHNIQUE

L'obtention des anticorps monoclonaux ; les hybridomes

La technique des hybridomes, mise au point en 1976, permet de constituer des clones à croissance illimitée *in vitro* (lignées) de cellules productrices d'un seul type d'anticorps. Le principe est basé sur la possibilité de faire fusionner des cellules animales en culture et de sélectionner des phénotypes particuliers grâce à des milieux de culture appropriés. Plusieurs lignées de cellules de myélome (cellules lymphocytaires immortelles, issues de tumeurs cancéreuses) de rat ou de souris ont été isolées, cultivables *in vitro*, mais dont la croissance est inhibée sur un milieu de culture sélectif dit «HAT». On injecte l'antigène (ou un mélange d'antigènes) pour lequel on veut obtenir des anticorps monoclonaux à une souris ; celle-ci s'immunise et produit normalement dans sa rate différents types de lymphocytes B reconnaissant cet (ou ces) antigène(s). La rate de l'animal sacrifié est prélevée, dilacérée et mise en contact avec les cellules de myélome dans des conditions où la fusion cellulaire peut avoir lieu ; les lymphocytes B stimulés et ces dernières forment ainsi des cellules hybrides (**hybridomes**), qui sont sélectionnés sur le milieu HAT. Dans ces conditions, en effet, toutes les cellules vont mourir, à l'exception des lymphocytes fusionnés avec le myélome. Les hybridomes ont la capacité de se multiplier indéfiniment et de sécréter un seul type d'anticorps particulier. La population mélangée de clones immortels ainsi obtenue est diluée de sorte que chacun d'eux puisse être analysé individuellement. Les hybridomes intéressants sont sélectionnés (souvent grâce à la technique d'immunocytochimie) et ensuite cultivés à grande échelle. Cette technique a révolutionné l'emploi des anticorps comme outils en biologie cellulaire et moléculaire.

extraits ou des fractions cellulaires purifiées, ou bien sur des coupes de cellules ou d'organes (immunocytochimie). Ils peuvent aussi servir à purifier cet antigène en utilisant la technique de **chromatographie d'affinité** après couplage de l'anticorps, dont on peut disposer en grande quantité, à un support approprié. Les anticorps monoclonaux sont aussi des réactifs exceptionnels pour la biochimie ou la biologie moléculaire, en raison de leur spécificité de reconnaissance très pointue d'un seul épitope de l'antigène. Un intérêt majeur de ces anticorps est qu'ils peuvent être obtenus à partir de mélanges d'antigènes dans lesquels une molécule intéressante à étudier se trouve parfois très minoritaire ; la production abondante d'anticorps contre cette dernière par la voie naturelle s'avèrerait, dans ce cas, inopérante. Associée à la technique du clonage des gènes, la production des anticorps monoclonaux permet, en théorie, d'identifier les dizaines de milliers de protéines (et les gènes correspondants) qui constituent les cellules des organismes complexes.

C'est au moyen de cette technique que l'organisation du cytosquelette des Protistes Ciliés, qui est d'une grande complexité, a pu être précisée. Chez ces micro-organismes, l'immunofluorescence permet de distinguer, outre les cils qui sont leur caractéristique morphologique majeure, plus d'une dizaine de systèmes constitués de microtubules, dont certains sont stables et d'autres labiles. Chez la paramécie, on décrit par exemple : les racines ciliaires, les réseaux associés à la bouche et ceux entourant les canaux des vacuoles pulsatiles, un réseau hyaloplasmique labile, le cytofuseau cortical intervenant lors de la division, etc. (voir *figure* 11.11). C'est grâce à cette architecture complexe que la paramécie peut assurer la multiplicité des fonctions physiologiques qui ont été présentées dans le chapitre 2, et qui font d'elle un véritable organisme en miniature. Des différences chimiques très subtiles entre les molécules de tubuline composant ces diverses structures ont été mises en évidence grâce aux anticorps monoclonaux.

3.3. Rôles du cytosquelette dans l'architecture cellulaire

3.3.1. Structures stables à base de tubuline

Les édifices stables à base de microtubules sont toujours d'une grande complexité structurale. Outre la tubuline, on y rencontre un nombre élevé de protéines faisant partie de la famille des MAPs, dont le rôle est d'établir et/ou renforcer les liens existant entre les microtubules.

• Les **centrioles** sont des structures cylindriques d'environ 0,5 µm de long sur 0,2 µm de diamètre, invisibles individuellement en microscopie photonique. Ils sont constitués de neuf **triplets** parallèles de courts **microtubules**, formés chacun de trois

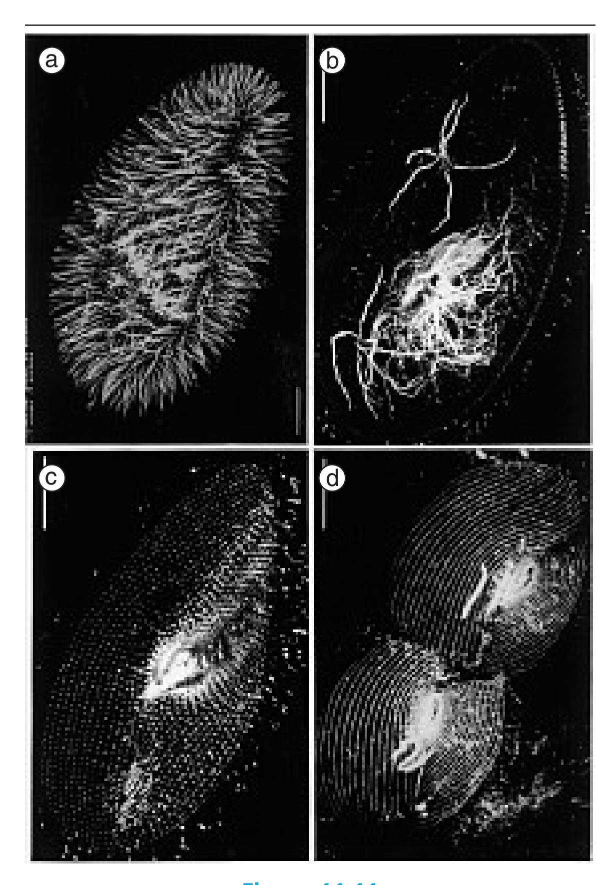
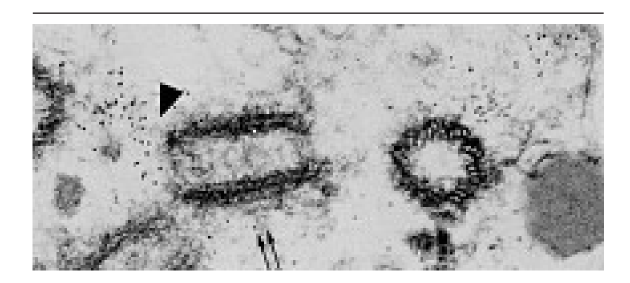


Figure 11.11

Aspect de quelques structures cytosquelettiques constituées de microtubules chez la paramécie

Observation par immunofluorescence indirecte en microscopie confocale. **(a)** ciliature ; **(b)** réseaux entourant les canaux vacuolaires et la bouche ; **(c)** corpuscules basaux ; **(d)** cytofuseau. Clichés A. Fleury, Labo. BC4, Orsay.



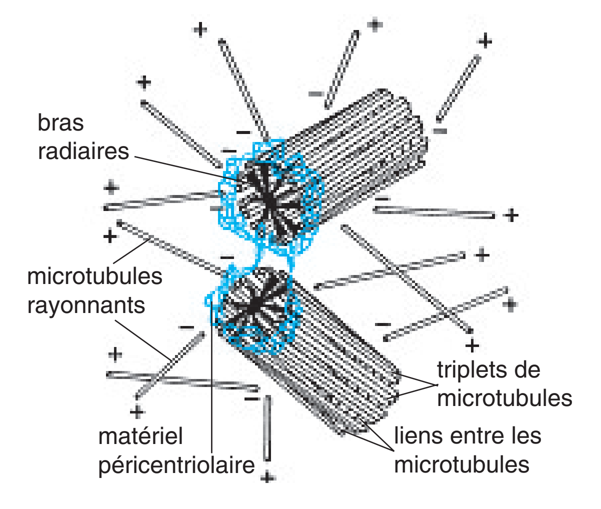


Figure 11.12

Coupes transversale et longitudinale de centrioles

Les triplets ne sont pas parallèles à l'axe du cylindre, mais légèrement inclinés, ce qui donne une structure légèrement gauchie. Des coupes transversales montrent que des ponts tangentiels unissent les triplets les uns aux autres, formant ainsi un édifice rigide. Observation en microscopie électronique ; cellules d'oviducte de caille ; × 67 500. Clichés M. Lemullois, Labo. BC4, Orsay.

microtubules accolés parallèlement les uns aux autres et partageant deux à deux trois protofilaments ; seul le microtubule le plus interne est entier (voir *figure* 11.12). Les centrioles vont toujours par paires et sont le plus souvent situés à proximité l'un de l'autre (on parle de **diplosome**), généralement au voisinage du noyau ; disposés perpendiculairement l'un à l'autre, ils sont réunis, à leur base, par du matériel fibrillaire encore mal connu. Ils constituent le cœur d'une structure appelée **centrosome**, ou **centre cellulaire**, observée depuis les débuts de la cytologie classique, car facilement colorable par les colorants habituels (voir *figure* 2.7).

Le centrosome est une petite masse sphérique de hyaloplasme fortement structuré (matériau péricentriolaire) incluant, selon le moment du cycle cellulaire, un ou deux diplosomes. La microscopie électronique montre qu'un grand nombre de microtubules rayonnants sont enracinés dans le centrosome, bien qu'ils n'aient aucun contact direct avec ceux des centrioles. La duplication de ces derniers, événement capital de la division cellulaire, sera étudiée dans le chapitre 12. Cette structure est présente chez toutes les cellules animales, chez de nombreuses Algues unicellulaires, chez certains Champignons et les Végétaux inférieurs, mais absente chez les Végétaux supérieurs.

• Les **corpuscules basaux** (ou **cinétosomes**) sont des structures rencontrées à la base des cils et des flagelles (voir plus loin), dont la taille et l'organisation sont très voisines de celles des centrioles. Cependant, outre les triplets périphériques de microtubules, ils possèdent des lames rayonnantes partant de chaque triplet et se dirigeant vers le centre du cinétosome ; l'axe de ce dernier est marqué par une structure tubulaire non constituée d'un microtubule.

• Les **cils** et les **flagelles** sont de fines structures digitiformes (0,25 µm de diamètre), souples et mobiles, portées par la surface des cellules ; leur longueur est de 5-10 µm pour les premiers, et de plusieurs dizaines de µm (jusqu'à 200) pour les seconds. Leur organisation moléculaire est apparemment identique, mais leur mode de fonctionnement et leur type de mouvement sont différents. Limités par la membrane plasmique, ils portent en leur centre un système complexe de microtubules noyé dans le hyaloplame, appelé **axonème** ciliaire (voir *figure* 11.13). Cette disposition est très générale chez les Eucaryotes, mais on rencontre quelques exceptions. Il existe divers dispositifs accrochant les doublets les uns aux autres ainsi qu'aux microtubules centraux, ce qui conduit à une grande cohésion et une grande solidité de l'ensemble, mais qui participe aussi à sa mise en mouvement, comme on le verra plus loin :

– deux bras courbés partent du microtubule complet d'un doublet et entrent plus ou moins en contact avec le microtubule incomplet le plus proche du doublet voisin ; ces bras, constitués d'une grosse protéine nommée **dynéine** (2.10^3 kDa ; environ 10 chaînes polypeptidiques), sont disposés régulièrement (tous les 24 nm) sur toute la longueur des microtubules, le long de l'axonème ;
– des ponts tangentiels internes unissent deux doublets voisins ; ils sont constitués d'une protéine nommée **nexine** ;
– des **fibres rayonnantes**, elles aussi disposées longitudinalement de façon régulière, partent de chaque doublet et se dirigent vers le centre de l'axonème.

Les cils et les flagelles sont toujours portés, dans le hyaloplasme, par des corpuscules basaux avec lesquels ils sont en continuité directe au niveau des deux microtubules les plus internes de leurs triplets caractéristiques. Entre la base du cil et le sommet du cinétosome existe une zone de transition complexe représentée dans la *figure* 11.13.

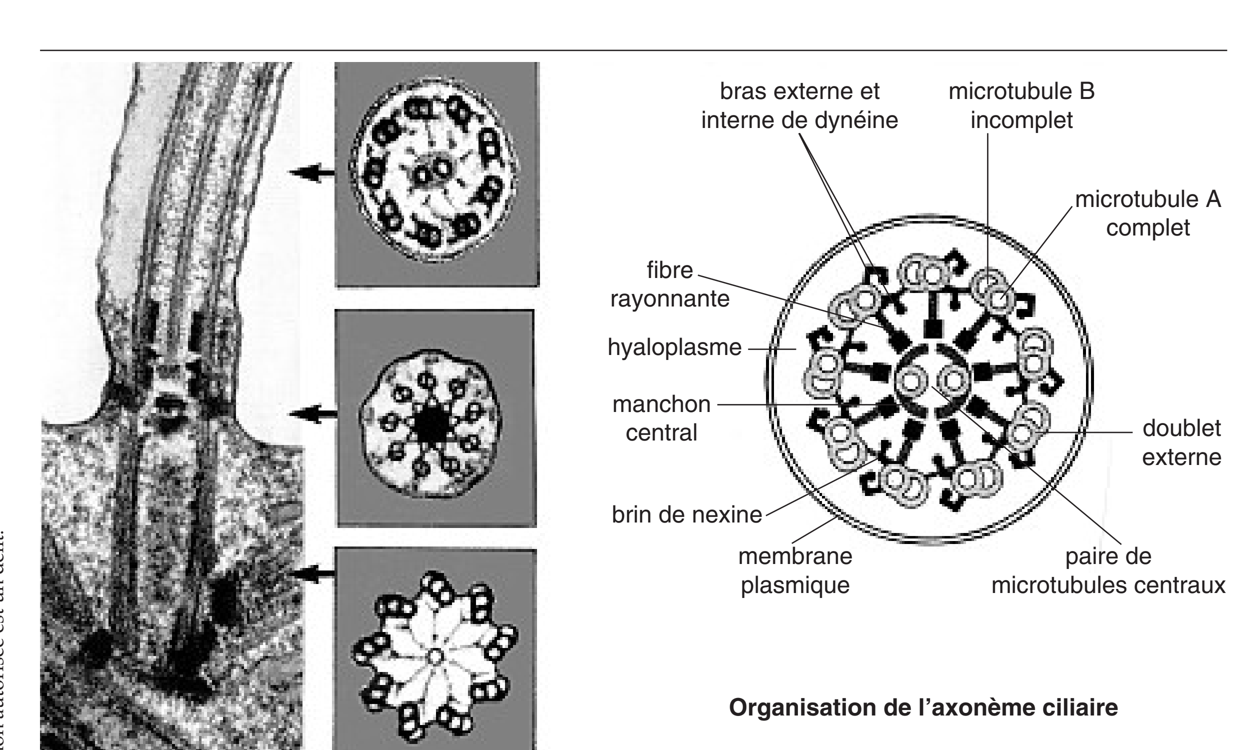


Figure 11.13

Coupes transversales et longitudinale de cil ou de flagelle eucaryotique

L'axonème est constitué de 9 doublets de longs microtubules proches de la membrane plasmique, disposés en anneau, parallèles à l'axe et partiellement soudés par 3 protofilaments (le microtubule le plus interne est complet). Un doublet axial formé de deux microtubules parallèles, séparés l'un de l'autre, court également tout du long du cil ; ils semblent noyés dans un manchon de matériel dense. Le corpuscule basal, qui ancre l'axonème dans le cytoplasme, a la même structure qu'un centriole. × 67 500. Clichés M. Lemullois, Labo. BC4, et Labo-BG, Orsay.

Dans des conditions naturelles ou artificielles de régénération des cils ou des flagelles, le corpuscule basal seul est capable de reproduire ces structures. Les expériences d'autoradiographie prouvent que la croissance de l'axonème s'effectue par la partie distale (+) des doublets : la tubuline provenant du corps cellulaire remonte le long du cil ou du flagelle en croissance pour participer à la polymérisation.

Les cils et les flagelles sont aisément séparés des corps cellulaires qui les portent par des traitements chimiques ou mécaniques. Une simple centrifugation, suivie d'un traitement par un détergent doux approprié qui élimine la membrane plasmique, permet de purifier de grandes quantités d'axonèmes et d'identifier par électrophorèse leurs protéines spécifiques. Divers protocoles conduisent à éliminer tel ou tel constituant spécifique de l'axonème, comme l'attestent les contrôles en microscopie électronique ; ceci autorise une véritable dissection moléculaire de cette structure.

À la différence des édifices qui viennent d'être étudiés, on connaît certaines structures à rôle architectural qui présentent un caractère de labilité vis-à-vis des agents physicochimiques signalés au début du chapitre. C'est le cas, par exemple, du cytosquelette très particulier des **hématies nucléées** et ovoïdes des Vertébrés non mammaliens ; celui-ci est formé d'un faisceau circulaire de quelques dizaines de microtubules entourant la cellule à la manière d'un cerceau. Cette structure est nucléée par un centrosome lui-même périphérique. Un simple abaissement de la température vers 0°C suffit à dépolymériser ces microtubules, sans affecter les centrioles ; le phénomène est totalement réversible. C'est aussi le cas des axonèmes des **tentacules** des **Héliozoaires** dont les microtubules se dépolymérisent complètement dans les mêmes conditions. Enfin, les faisceaux de microtubules axiaux des prolongements des cellules nerveuses, parfois appelés **neurotubules**, qui constituent (en association avec des filaments intermédiaires) une armature stable conférant leur forme et leurs propriétés à ces structures cellulaires remarquables, sont aussi de type labile.

3.3.2. Structures stables à base d'actine

Bien que la molécule d'actine soit classiquement associée au mouvement cellulaire, à travers le couple actine/myosine caractéristique des sarcomères des fibres musculaires striées (voir paragraphe 3.4.4.), elle participe à la constitution de nombreux édifices stables rencontrés dans diverses cellules différenciées.

Divers types de cellules épithéliales animales sont connues pour posséder, sur leur face apicale, des structures appelées **bordures en brosse** ou **plateaux striés**, bien visibles en microscopie photonique ; c'est le cas, par exemple, des entérocytes ou des cellules rénales des Vertébrés. En microscopie électronique, ces structures apparaissent en fait constituées de fines digitations de 1 à 2 µm de haut, serrées les unes contre les autres, et appelées **microvillosités** ; leur cœur porte un faisceau de 25 à 30 fibres parallèles, bien visibles en coupe transversale, qui plonge assez profondément au sein du hyaloplasme (voir *figures* 6.1 et 11.14). Ces fibres sont en fait constituées de molécules d'actine, qui sont ancrées au sommet de la microvillosité au sein d'une masse amorphe. On observe aussi que celles-ci sont pontées latéralement les unes aux autres par du matériel opaque aux électrons, de même que les plus externes sont accrochées par endroits à la membrane plasmique. Certaines cellules de l'oreille interne des Vertébrés, qui sont spécialisées dans la perception des sons, portent également de longs prolongements appelés **stéréocils**, dont l'architecture est tout à fait comparable à celle des microvillosités intestinales ; leur taille est simplement beaucoup plus grande : 5-6 µm.

Toutes les cellules épithéliales des animaux sont rapprochées et accrochées les unes aux autres, au niveau de leurs faces latérales, par divers dispositifs reconnaissables en cytologie électronique : ce sont les jonctions intercellulaires, qui seront étudiées en détail dans le chapitre 13. Parmi celles-ci, les **ceintures d'adhérence**, qui font le tour des cellules dans leur partie apicale, sont formées de longs filaments disposés parallèlement à la membrane plasmique ; ce large faisceau continu est, ici aussi, constituée de molécules d'actine. Les cellules animales en culture qui croissent sur un substrat solide tendent à s'aplatir sur ce dernier et à s'ancrer solidement dessus. Nous avons vu plus haut qu'elles sont en fait traversées par des câbles corticaux stables formés d'actine, et localisés sur la face inférieure plane de la cellule (voir paragraphe 1.2.2.) ; leur disposition et leurs rapports avec les points de contact focaux sont visiblement en relation étroite avec l'architecture et la morphologie de ces cellules.

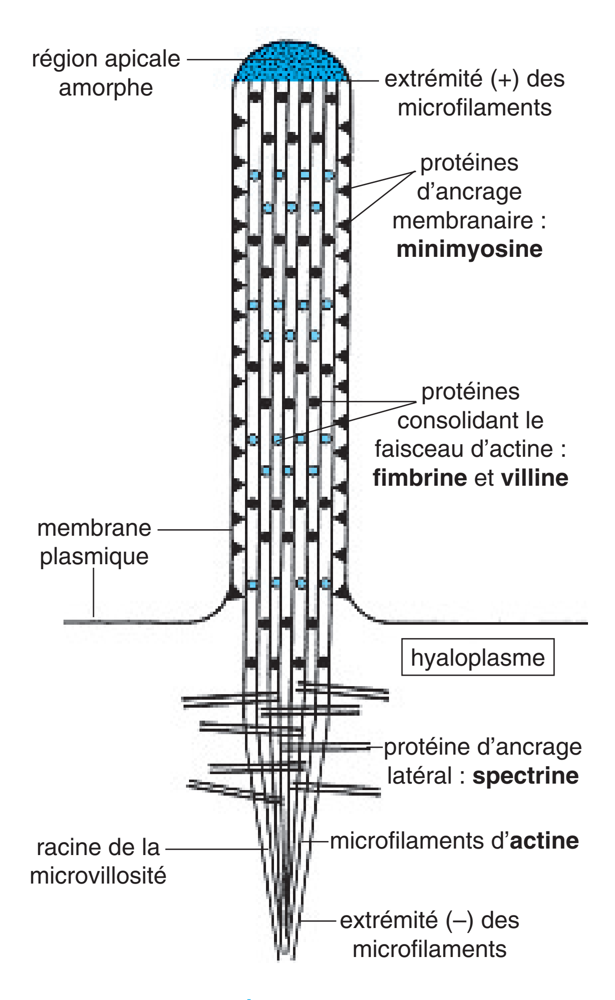


Figure 11.14

Schéma d'une coupe longitudinale d'une microvillosité intestinale

Un faisceau central de 25-30 microfilaments d'actine forme l'axe de la structure ; il est consolidé et associé à la membrane plasmique par de nombreuses protéines de liaison (voir aussi la *figure* 6.1). Le faisceau de microfilaments s'enfonce profondément dans le hyaloplasme, où il entre en contact avec les éléments du cytosquelette (réseaux d'actine et de filaments intermédiaires).

3.3.3. Importance architecturale des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont surtout abondants dans les cellules animales différenciées et ne se divisant plus ; ils sont absents des cellules embryonnaires ou des cellules en culture en prolifération rapide. Quelques rares types cellulaires n'en possèdent d'ailleurs pas (érythrocytes des Mammifères ; certaines cellules gliales du système nerveux central). Dans les cellules où on les trouve, ils constituent des édifices toujours en rapport avec une grande solidité mécanique (rôle d'armature ou d'échafaudage) ; leur rôle est donc essentiellement statique et structural.

• Dans les dérivés ectodermiques des Vertébrés (épiderme et **phanères**), les cellules accumulent de grandes quantités de fibres de kératine qui s'associent progressivement entre elles par des liaisons covalentes ; ces cellules se déshydratent, s'aplatissent et meurent tandis que leur squelette kératinisé persiste. Repoussées vers la partie superficielle de la peau par des cellules plus jeunes issues de **cellules-souches**, elles seront éliminées par desquamation ; l'empilement de plusieurs dizaines de ces cellules mortes constitue une couche protectrice imperméable et résistante, qui recouvre tout l'animal. Les cheveux, les ongles, les plumes, les griffes, les sabots, sont des formations épidermiques constituées elles aussi de kératines. On connaît plusieurs dizaines de formes, légèrement différentes, de ces molécules ; elles sont codées par des gènes distincts appartenant à une même famille multigénique. L'expression différentielle de ces gènes dans les divers tissus d'un même organisme conduit à une large palette de spécialisations structurales et fonctionnelles.

• Au sein des cellules, les filaments intermédiaires sont toujours en rapport avec des **jonctions intercellulaires** particulières. Dans les cellules épithéliales, par exemple, les faisceaux de **tonofilaments de kératine** traversent les cellules de part en part ou longent la membrane plasmique, puis convergent vers les desmosomes ponctuels qui accrochent les cellules épithéliales les unes aux autres ; de même, les hémidesmosomes ancrent ces cellules dans la matrice extracellulaire (voir chapitre 14). Tout en organisant à l'évidence l'architecture de ces cellules, les tonofilaments assurent, *via* les desmosomes, une continuité entre les réseaux des cellules voisines ; on obtient ainsi une structure continue (dite transcellulaire) conférant à l'ensemble du feuillet épithélial des propriétés à la fois élastiques et résistantes.

• Dans les prolongements des neurones, les **neurofilaments** contribuent, en formant des faisceaux serrés appelés **neurofibrilles**, à leur architecture filiforme très particulière ; ceux-ci peuvent ainsi atteindre des tailles extraordinaires pour des cellules (plusieurs dizaines de centimètres !). Il faut évidemment mettre ce fait en relation avec leur fonction spécialisée de conduction à distance d'un signal électrique.

• Dans les myofibrilles, l'alignement des filaments fins des sarcomères et l'accrochage des **disques Z** entre eux sont assurés grâce à un réseau de desmine (voir plus loin).

• La structuration du noyau, au moyen de la **lamina** de l'enveloppe nucléaire (constituée par les lamines) et du **nucléosquelette**, met en œuvre des filaments intermédiaires (voir chapitre 8).

Plusieurs génopathies humaines concernant les filaments intermédiaires sont connues, dont certaines formes sont très sévères.

ENCART BIOMÉDICAL

Les maladies génétiques du cytosquelette

Le syndrome rare nommé «épidermolyse bulleuse» est une maladie cutanée à transmission autosomique dominante. Elle se manifeste par des décollements cutanés spontanés, ou bien liés à des microtraumatismes ou de simples chocs, conduisant à des cloques ou des ampoules multiples. Il a été montré, à la suite de l'obtention d'un modèle animal de cette affection (souris transgéniques) que les patients possèdent des gènes de kératines ayant subi une mutation ponctuelle. Ce défaut génétique conduit à la production de molécules de kératine altérées dans leur partie centrale, normalement organisée en hélice α. L'assemblage des filaments intermédiaires, qui sont plus courts et plus fragiles que les formes normales, se réalise mal. Toute l'architecture cytosquelettique des kératinocytes, dont l'empilement forme l'épiderme pluristratifié, s'en trouve perturbée et ce dernier ne peut plus assurer son rôle primordial de protection (mécanique, hydrique et contre les pathogènes) de l'organisme.

Une autre maladie touche les neurofilaments qui consolident, avec les microtubules, les prolon-gements des cellules nerveuses. Il s'agit de la «sclérose amyotrophique latérale», ou Maladie de Charcot ; Stephen Hauwking, physicien mondialement connu est affecté par cette maladie grave. Les symptômes en sont : une dégénérescence progressive des motoneurones, conduisant à une paralysie et une atrophie musculaires ; la maladie est souvent fatale, pour des raisons respiratoires. Au plan cellulaire, les neurones apparaissent «engorgés» de neurofibrilles, sous la forme d'amas serrés et non organisés. La plupart des cas d'amyotrophie sont d'origine sporadique, mais 10 % sont clairement héréditaires. On ne sait pas encore si cette maladie est due à des mutations dans les gènes codant les polypeptides des neurofilaments eux-mêmes, ou dans d'autres gènes. Une intervention des radicaux libres, dont on connaît la réactivité et la nocivité vis-à-vis des protéines, a été évoquée comme origine possible des symptômes.

3.3.4. Rapports entre les différents éléments du cytosquelette. Relations entre les microtubules et d'autres structures cellulaires

L'immunofluorescence en double marquage met en évidence, chez les cellules animales ou végétales, l'existence de relations et d'interactions étroites entre les divers constituants du cytosquelette. Par ailleurs, l'utilisation de drogues qui déstabilisent les microtubules a permis de démontrer que le réseau microtubulaire sert de support ou de guide à de nombreuses autres structures ou organites cellulaires.

• Dans les **fibroblastes en culture**, les réseaux de microtubules et de filaments intermédiaires (vimentine) sont souvent superposables, bien que non identiques, ce qui est l'indice d'une association étroite, de nature encore inconnue, entre eux (voir plus haut). De même, dans les cellules épithéliales de rongeurs en culture, on observe que les réseaux de kératine et de vimentine suivent un tracé exactement semblable.

• Dans les **prolongements des cellules nerveuses**, il existe des rapports étroits (sous forme de pontages latéraux visibles en microscopie électronique) entre les microtubules et les filaments intermédiaires qui sont disposés parallèlement à eux. La longueur des premiers n'excédant pas quelques dizaines de μm, les neurofilaments contribuent sans doute à la réalisation d'une structure axiale continue et rigide, nécessaire au maintien de la structure et du fonctionnement des axones.

• Dans les **cellules embryonnaires** à l'origine des cellules musculaires striées, il existe un rapport clair entre la présence des microtubules et la mise en place orientée des filaments d'actine et de myosine. En effet, lorsque de la colchicine est appliquée à des myoblastes, lors de leur fusion qui donne normalement de longs myotubes plurinucléés (au sein desquels se mettront en place les

myofibrilles), la désorganisation du cytosquelette qui s'en suit s'accompagne d'une orientation anarchique des sarcomères. Les microtubules alignés agissent directement comme des rails le long desquels s'orientent les éléments de structure musculaires.

• **Les mitochondries** s'alignent visiblement le long des microtubules, en formant des chaînes, et elles peuvent même se déplacer grâce à eux, aussi bien dans des cellules banales, comme les fibroblastes, que dans des cellules différenciées telles que les neurones (transport axonal ; voir plus loin).

• **L'appareil de Golgi**, le réticulum endoplasmique et diverses vésicules ont une distribution déterminée par les microtubules ; en ce sens, ils possèdent donc un rôle architectural certain. Lors de la mitose, par exemple, les microtubules du hyaloplasme interphasique disparaissent au profit de la mise en place du fuseau de division (voir chapitre 12). À l'occasion de ces remaniements, on observe que les dictyosomes de l'appareil de Golgi (souvent concentré à proximité du centrosome) se désintègrent en une multitude de vésicules qui se répandent dans tout le cytoplasme. Après la mitose, le cytosquelette interphasique se remet en place : les vésicules dispersées convergent et glissent le long des microtubules reconstitués et forment à nouveau des empilements caractéristiques de saccules. Des résultats semblables sont obtenus avec des drogues qui déstabilisent réversiblement le cytosquelette microtubulaire. De même, la large répartition des saccules membranaires du réticulum endoplasmique au sein du cytoplasme des cellules en culture est dictée (mais de manière opposée) par les microtubules rayonnant à partir du centrosome. Des protéines de type **dynéine** ou **kinésine** (voir plus loin) sont connues pour se lier respectivement à ces deux compartiments et elles servent de moyen d'accrochage des membranes aux microtubules (et donc de déplacement).

3.4. Rôles du cytosquelette dans les mouvements intracellulaires

Le cytosquelette est impliqué dans tous les mouvements intracellulaires ; comme ceux-ci se manifestent à l'occasion d'activités variées, qui ont déjà éventuellement été traitées dans d'autres chapitres, ou qui le seront ultérieurement, nous ne développerons ici que certains points particuliers.

3.4.1. Fuseau de division. Mouvements des chromosomes

L'entrée en division s'accompagne de profonds remaniements du cytosquelette microtubulaire, car un dispositif complexe lui-même constitué de microtubules se met alors en place : le **fuseau mitotique**, qui intervient dans le partage des chromosomes dans les deux cellules-filles. L'exemple des fibroblastes, cellules peu différenciées et proliférant aisément, peut être décrit. Lorsque ces cellules en culture forment une monocouche sur le substrat, cessent de se déplacer et de se multiplier, leur cytosquelette microtubulaire présente la disposition caractéristique vue dans la figure 11.5 : de très nombreux microtubules nucléés par le centrosome emplissent le hyaloplasme et rayonnent vers la périphérie. Malgré son immobilité apparente, cette structure est hautement dynamique : à tout instant certains microtubules disparaissent tandis que d'autres s'allongent (instabilité dynamique). Si ces cellules sont stimulées pour l'entrée en division, tout ce réseau labile disparaît en peu de temps et laisse la place à différentes catégories de microtubules spécialisés, dits astériens, kinétochoriens et polaires, qui participent plus ou moins directement au mouvement des chromosomes ; ces événements seront présentés en détail dans le chapitre 12.

3.4.2. Déplacement des organites. Transport intracellulaire

L'observation des cellules vivantes montre que leur cytoplasme n'est pas figé : les organites ou les particules qu'il contient se déplacent sans cesse et rapidement, d'une manière qui semble non aléatoire. On suspecte depuis longtemps que ceux-ci sont guidés par des fibres ou des rails invisibles, qui organisent un trafic intracellulaire hautement ordonné et parfois de grande ampleur. Il est maintenant démontré que le cytosquelette est à la fois le support et le moteur de tous ces mouvements au sein du hyaloplasme. Deux exemples éclairants peuvent être décrits à ce sujet : le déplacement des granules pigmentaires dans les **chromatophores** et le **transport axonal** des cellules nerveuses.

• Les chromatophores sont des cellules pigmentaires caractéristiques du tégument de nombreux Poissons et Amphibiens ; elles leur permettent de changer de couleur en fonction du milieu et

d'échapper à leurs prédateurs (mimétisme). Le mécanisme, à l'échelle cellulaire, est le suivant : ces cellules aplaties contiennent une multitude de **granules de pigment** minuscules (rouges, bruns, noirs), qui ont la propriété remarquable, soit d'occuper la totalité du hyaloplasme, soit de se concentrer autour du noyau central. Dans le premier cas, la cellule prend une couleur sombre ; dans le second, elle apparaît globalement claire, d'où les changements de couleur de la peau de l'animal. La distribution réversible des granules est commandée par des stimuli hormonaux ou nerveux. Des études en microscopie électronique à haute tension ou en cryodécapage montrent que les granules sont étroitement associés à des microtubules rayonnants, et qu'ils se déplacent, dans un sens ou dans l'autre, le long de ces derniers.

• Les cellules nerveuses sont caractérisées par la présence de longs et fins prolongements, nommés **axones**, qui atteignent parfois 1 m de long chez l'Homme. Dans ces cellules, la synthèse protéique a seulement lieu au sein du corps cellulaire où sont localisés les ribosomes et le réticulum endoplasmique ; de même, la biogenèse des organites qui dépendent des produits de cette synthèse, comme les mitochondries, est restreinte à ce territoire. Or, de nombreuses protéines, vésicules ou organites sont amenés à fonctionner au niveau de la terminaison cellulaire, dans la région synaptique ; ces derniers doivent donc parcourir toute la longueur de l'axone avant d'atteindre ce lieu. Diverses expériences démontrent l'existence de ce transport axonal ; elles consistent : 1) à marquer *in vivo* ces composés par injection d'acides aminés radioactifs dans les ganglions des racines nerveuses dorsales de la moelle épinière (où sont localisés les corps cellulaires), et 2) à analyser la progression de la radioactivité le long des nerfs qui en partent par comptage direct ou autoradiographie sur des segments découpés. Ces expériences montrent que ce **transport centrifuge** est très rapide et atteint 2-4 µm par seconde pour certaines vésicules golgiennes ; le transport des mitochondries et de diverses molécules fibreuses s'effectue, quant à lui, à une vitesse moyenne dix fois plus faible. Il existe aussi un **transport centripète** qui fait remonter rapidement des vésicules et des particules issues des terminaisons nerveuses, vers le corps cellulaire, où elles feront l'objet d'une dégradation dans le compartiment lysosomal.

D'autres exemples de transport de vésicules au sein des cellules peuvent être donnés.

• Lors de la division cellulaire chez les Végétaux supérieurs, la formation de la cloison qui sépare les deux cellules-filles met en jeu de nombreuses vésicules de sécrétion d'origine golgienne qui sont guidées, grâce à des microtubules du fuseau et/ou des microfilaments, vers le plan médian de la cellule où elles se rassemblent puis fusionnent au niveau d'une structure nommée **phragmoplaste** (voir chapitre 12).

• Lors de l'allongement des **cellules apicales** des filaments de certaines Algues ou Champignons, ou bien des protonémas de Mousses, dont la division assure la croissance en longueur, l'apport localisé de matériel pariétal d'origine golgienne est conditionné par la présence simultanée de microtubules et de microfilaments. Disposés parallèlement le long de l'axe de la cellule, ils servent de rails pour guider les vésicules dont l'exocytose est ainsi confinée à la partie terminale de l'apicale.

• Dans les cellules animales sécrétrices exocrines, l'émission des vésicules est toujours localisée dans la région tournée vers la lumière de la glande (voir chapitre 9). L'utilisation de drogues bloquant ce phénomène, et qui sont connues pour interférer avec les microfilaments d'actine (cytochalasine ou phalloïdine ; voir plus loin), montre que l'exocytose est aussi dépendante du cytosquelette.

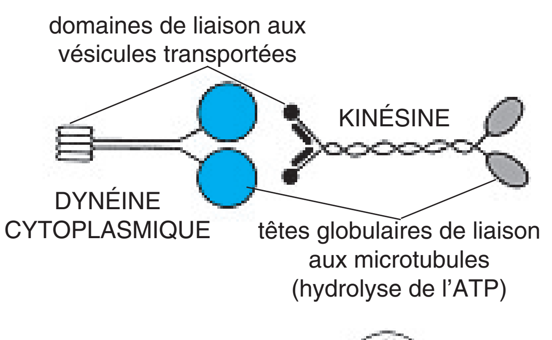
3.4.3. Notion de moteur moléculaire associé aux microtubules

Les déplacements de vésicules le long des axones ont été observés en temps réel, sur des axones géants isolés de calmar, grâce à des systèmes de vidéoamplification des images associés au contraste interférentiel. Ces analyses suggèrent que les particules se déplacent le long de rails qui sont constitués par les microtubules, dans un sens ou dans l'autre selon leur nature. Une interaction directe et dynamique entre particules à transporter et microtubules doit donc exister, faisant intervenir à l'évidence des protéines désignées plus haut comme des MAPs.

Deux types de protéines intervenant dans le mouvement des particules le long de l'axone de calmar ont été isolées ; chacune d'elles est spécifique du transport dans un seul sens. Le fonctionnement de ces **moteurs moléculaires** est démontré directement *in vitro*, dans des systèmes reconstitués à partir de protéines purifiées ; la présence

d'ATP, comme source d'énergie, est indispensable à leur activité. La **kinésine** est un complexe de quatre chaînes polypeptidiques (380 kDa) dont la structure générale, visualisable par coloration négative, rappelle celle de la myosine : deux têtes globulaires portées par une longue queue en double hélice α. Elle se lie aux microtubules par ces deux têtes et aux vésicules à transporter par son extrémité opposée ; elle assure le transport centrifuge dans les axones en progressant de l'extrémité (–) d'un microtubule vers son extrémité (+). Le mécanisme intime de la transformation de l'énergie chimique contenue dans l'ATP en énergie physique ressemble sans doute à celui mis en jeu dans le phénomène classique de glissement des têtes de myosine le long de l'actine (voir plus loin). La **dynéine cytoplasmique** est la protéine qui assure le glissement centripète des particules, de l'extrémité (+) vers l'extrémité (–) des microtubules, dans les axones. C'est un très gros complexe (10^3 kDa) portant lui aussi deux têtes globulaires se liant aux microtubules ; sa structure et son fonctionnement ressemblent beaucoup à ceux de la dynéine rencontrée dans les cils et les flagelles, que nous décrirons plus loin (voir *figure* 11.15).

La découverte de ces deux protéines motrices fournit donc une explication à de très vieilles observations sur le déplacement orienté des organites dans les cellules. Malgré cette avancée considérable, il reste cependant beaucoup à faire pour comprendre le détail des mécanismes moléculaires mis en œuvre dans le transport.



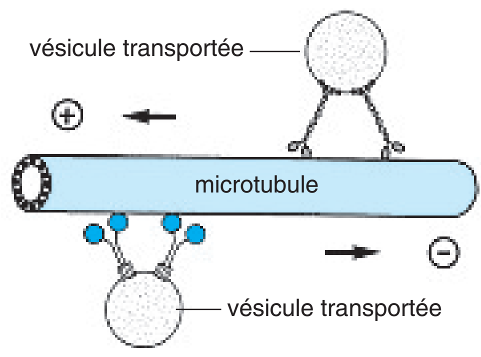


Figure 11.15

Moteurs moléculaires associés aux microtubules

La kinésine et la dynéine cytoplasmique assurent le transport de vésicules dans deux directions opposées le long d'un microtubule. Ces molécules sont formées de deux têtes globulaires, qui glissent à la surface de ce dernier, et de queues plus ou moins longues, qui fixent des vésicules spécifiques.

3.4.4. Contraction des cellules animales. Rôle de l'interaction entre actine et myosine

Chez les Animaux, la contraction des muscles est assurée par les **fibres musculaires**. Dans le cas des Vertébrés, on distingue plusieurs catégories de ces cellules, suivant qu'elles entrent dans la constitution des muscles squelettiques, du muscle cardiaque ou des muscles lisses ; ceux-ci interviennent respectivement, en simplifiant beaucoup, dans la locomotion, le pompage du sang et le péristaltisme intestinal ou la contraction des vaisseaux. La propriété commune à toutes ces cellules est leur aptitude à se contracter individuellement, ce phénomène étant lié à un mécanisme protéique très complexe dont les détails sont maintenant bien connus ; il s'agit en fait du premier système faisant intervenir un moteur moléculaire historiquement décrit. L'élucidation de ce mécanisme a constitué un des grands moments de la biologie cellulaire et il représente un volumineux et classique chapitre de la physiologie animale ; nous nous contenterons de rappeler brièvement ses principales caractéristiques.

• **Organisation générale des fibres musculaires striées**. Les muscles striés squelettique et cardiaque tirent leur nom du fait qu'ils sont constitués de cellules apparaissant striées longitudinalement, au microscope. Les cellules des premiers sont géantes (plusieurs centimètres de long) et plurinucléées ; leur cytoplasme est empli de nombreuses **myofibrilles**, structures allongées dans l'axe de la cellule, qui sont formées d'unités répétées appelées **sarcomères** (voir *figure* 11.16). Dans le cas du second, les cellules sont courtes, uninucléées et solidement accrochées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires multiples ; les myofibrilles des cellules adjacentes sont dans le prolongement les unes des autres, grâce aux

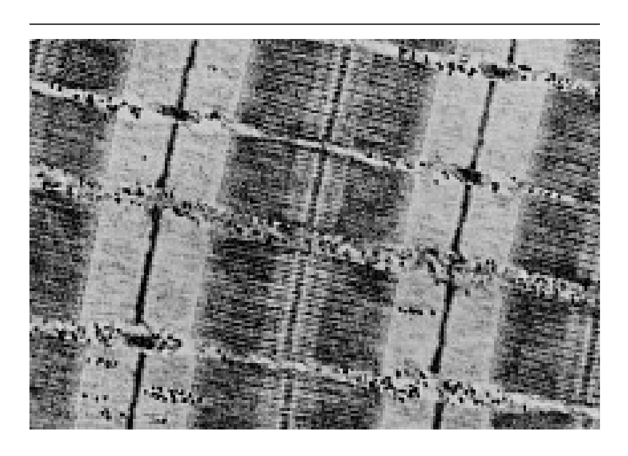


Figure 11.16

Coupe longitudinale d'une myofibrille dans une fibre musculaire striée

Chaque unité répétée, comprise entre deux bandes sombres fines (stries Z), représente un sarcomère (2,5 µm de long). Les filaments épais centraux sont constitués de faisceaux bipolaires de myosine ; ils sont encadrés par deux zones plus claires constituées de fins filaments parallèles : les microfilaments d'actine. Muscle gastrocnémien d'Amphibien ; microscopie électronique ; × 40 000. Cliché J. André, Labo. BC4, Orsay.

disques intercalaires qui les unissent. Ces deux types cellulaires sont caractérisés par la présence d'un vaste réticulum lisse nommé **réticulum sarcoplasmique**, dont la fonction est de réguler la concentration du hyaloplasme en ions Ca^{2+} (voir chapitre 5). L'abondance en **mitochondries** témoigne des besoins très importants en énergie que présentent ces cellules (voir chapitre 10).

• **Organisation moléculaire des sarcomères**. La structure symétrique de ces unités est classique : deux ensembles de microfilaments parallèles d'actine s'intercalent dans un ensemble de filaments plus épais constitués de **myosine** (myosine II, 510 kDa), avec lesquels ils contractent des liaisons latérales. Les microfilaments sont renforcés longitudinalement par des molécules de liaison de type **tropomyosine** et recouverts localement de molécules de **troponines**, dont le rôle est capital dans le mécanisme de la contraction. Les molécules de myosine sont formées de six sous-unités et ont une forme très caractéristique : une longue queue fibreuse munie de deux têtes globulaires ; elles sont associées par centaines en faisceaux bipolaires épais situés au milieu des sarcomères. Les microfilaments sont ancrés par leur extrémité (+) dans les stries Z grâce à des molécules de type **vinculine**, et maintenus à équidistance les uns des autres par des molécules d'**α actinine**. Les différentes stries Z sont réunies entre elles et alignées par un réseau de **desmine**. L'actine et la myosine représentent 66 % des protéines totales du sarcomère. De nombreuses autres molécules (> 30) entrent dans la constitution de ce dernier, dont les fonctions ne sont pas toutes identifiées ; parmi celles-ci, la **titine** (une énorme protéine de 3 000 kDa) oriente et consolide les faisceaux de myosine, tandis que la **nébuline** s'associe à l'actine et contrôle la longueur des microfilaments.

• **Contraction des sarcomères**. La contraction des fibres musculaires est assurée grâce au raccourcissement simultané de tous leurs sarcomères. Le glissement des filaments de myosine sur ceux d'actine est permis par un cycle complexe d'accrochage, de basculement et de décrochage de leurs têtes globulaires mobiles sur les microfilaments ; pour les détails de ce cycle, qui est mû par l'hydrolyse de l'ATP, voir l'ouvrage de Biochimie de G. Hennen. Il faut bien comprendre que la polarité et la disposition symétrique des microfilaments, ainsi que le caractère bipolaire des faisceaux de myosine, sont des éléments cruciaux de ce dispositif par rapport à son fonctionnement. Tous les aspects physiologiques de la contraction musculaire : arrivée et transmission du signal électrique au niveau de la synapse neuromusculaire, conduction du potentiel d'action le long des tubules transverses, libération et pompage du Ca^{2+}, interactions avec les troponines, etc., ne peuvent être décrits ici.

Il existe enfin des phénomènes localisés de contraction du cytoplasme dans les cellules les plus banales. La microscopie électronique et l'immunocytochimie montrent la présence de **minisarcomères** plus ou moins diffus au sein de leur hyaloplasme. Ces structures sont mises en œuvre en particulier lors de la division cellulaire ; le rôle d'un **anneau contractile** constitué d'actine et de myosine, au cours de la cytodiérèse, sera décrit dans le chapitre 12. De même le mouvement amiboïde, qui sera traité plus loin, semble faire intervenir ce type d'organisation. La présence d'une ceinture contractile d'actine (ceinture d'adhérence ; voir chapitre 14) dans la zone apicale des cellules épithéliales pourrait expliquer un phénomène capital intervenant au cours du développement embryonnaire des Animaux, à savoir le plissement des feuillets épithéliaux. Enfin, la tension maintenue au sein des épaisses fibres toniques trouvées dans les cellules aplaties sur leur support serait aussi due à ces minisarcomères.

3.4.5. Mouvements de cyclose dans les cellules végétales

La plupart des cellules, chez les Algues ou les Végétaux verts, sont de grande taille et caractérisées par la présence d'une vaste vacuole centrale qui confine le cytoplasme à leur périphérie, sous la forme d'une fine pellicule appliquée contre la paroi. Dans les cellules d'élodée (une petite plante aquatique), par exemple, il est aisé d'observer un mouvement de grande ampleur des chloroplastes, qui sont passivement entraînés à une vitesse atteignant 4-5 mm par minute. Ce spectaculaire mouvement cytoplasmique d'ensemble porte le nom de **cyclose** ; il concerne tous les organites, visibles ou non (mitochondries, réticulum endoplasmique, vésicules diverses) et se présente sous la forme d'un courant hélicoïdal faisant le tour de la cellule. Grâce à ce dernier, le hyaloplasme est brassé de façon constante, ce qui permet sans doute le transport de protéines et de métabolites d'un bout à l'autre de la cellule ; si la diffusion seule de ces composés était en jeu, elle serait inefficace, compte tenu de la grande taille de la cellule.

La cyclose a été étudiée en détail chez certaines Algues (*Chara*, *Nitella*) dont les cellules plurinucléées atteignent plusieurs centimètres de long. Chez ces dernières, la microcinématographie montre que la pellicule cytoplasmique est divisée en deux zones concentriques dont les propriétés mécaniques sont très différentes : 1) une zone corticale rigide et immobile contenant les chloroplastes, non entraînés, dans ce cas, dans le mouvement, et 2) une zone interne plus fluide, qui est seule soumise à la cyclose. À la limite entre ces deux territoires, la microscopie électronique met en évidence une grande richesse en faisceaux d'actine, tous orientés de la même manière, et dans la direction du courant hyaloplasmique.

Des expériences ingénieuses (utilisant des microbilles introduites dans ces cellules vidées de leur cytoplasme fluide) suggèrent que le mouvement est dû à une interaction entre le réticulum endoplasmique du hyaloplasme fluide et le tapis sous-jacent stationnaire de microfilaments, par l'intermédiaire d'un type particulier de myosine : la **minimyosine** (myosine I ; 110 kDa). Cette protéine motrice diffère de la myosine musculaire par l'existence d'une queue beaucoup plus courte, capable de se lier aussi bien à l'actine qu'à des membranes cellulaires. Les molécules de minimyosine arrimées au réticulum se déplacent ainsi unidirectionnellement sur des rails d'actine par un glissement (consommant de l'ATP) semblable à celui décrit dans les cellules musculaires. Le déplacement de l'ensemble du réseau membranaire entraîne passivement tous les autres organites qui y sont associés ou simplement piégés ; nous avons donc ici un autre exemple de moteur moléculaire.

3.5. Rôles du cytosquelette dans la motilité cellulaire

Diverses structures spécialisées, comme les cils et les flagelles, interviennent le plus souvent dans la motilité des cellules individuelles au sein d'un liquide, mais il ne faut pas oublier qu'on les rencontre également dans des cellules immobiles organisées en tissus, chez les organismes pluricellulaires (y compris les plus simples : Éponges, Cnidaires, etc. ; voir chapitre 14). On peut rappeler le cas des cellules épithéliales ciliées des voies respiratoires des Vertébrés supérieurs (bronches…), chargées de faire remonter vers le pharynx un mucus chargé de poussières et de cellules mortes qui seront éliminées par le tractus digestif, celui des cellules ciliées de l'oviducte, chargées de propulser les ovules vers l'extérieur, ou bien celui des branchies de la Moule, qui déplacent l'eau et les particules en suspension. Dans tous ces exemples, les cils ou les flagelles servent à faire circuler un fluide à la surface des cellules. Chez les Protistes Ciliés, la fonction de locomotion et celle de mouvement des fluides (au niveau du cytostome) sont assurées par des ensembles de cils spécialisés localisés en des endroits différents de la surface cellulaire.

3.5.1. Approche expérimentale du mouvement flagellaire ou ciliaire

L'analyse électrophorétique révèle l'existence d'environ 200 chaînes polypeptidiques distinctes au sein des cils ou des flagelles, témoignant de leur complexité structurale. Grâce à la cytologie classique, complétée par la coloration négative, le cryodécapage profond et l'immunocytochimie, il a été possible de décrire leur structure fine et de localiser plusieurs de leurs protéines constitutives. De plus, divers systèmes reconstitués *in vitro*, assurant le fonctionnement de cils ou de flagelles isolés, ont permis de comprendre certains mécanismes biochimiques fondamentaux sous-jacents.

Cependant, comme c'est la règle pour de nombreux problèmes de biologie, la production de mutants facilite considérablement l'analyse ; plusieurs lignées mutantes d'un organisme modèle : l'Algue unicellulaire biflagellée *Chlamydomonas*, ont été isolées après mutagenèse. Caractérisés par une perte totale ou partielle de motilité, ces individus possèdent des flagelles déficients et dépourvus de telle ou telle structure cytologiquement identifiée (bras de dynéine, microtubules centraux…). Des études classiques de génétique ont conduit à caractériser les gènes et donc les protéines mises en jeu dans le fonctionnement normal du système. De nombreuses mutations spontanées touchant la structure des axonèmes sont aussi connues chez divers Animaux, y compris l'Homme. Ces anomalies sont responsables de la stérilité des individus mâles, en raison de déficiences de la motilité de leurs spermatozoïdes, et de nombreux troubles au sein des organes possédant des cellules ciliées, également non fonctionnelles (cellules bronchiques, par exemple).

3.5.2. Fonctionnement des cils et des flagelles

• **Mouvements ciliaire et flagellaire**. Ces deux types de mouvement se distinguent fondamentalement. Le premier rappelle le mouvement de la brasse, en natation ; il consiste en des cycles de battements actifs (ou coups de force) propulsant le fluide vers l'arrière, alternant avec un retour à la position initiale par une récupération souple n'offrant pas de résistance au milieu. Le second est une ondulation et consiste en la propagation d'une onde sinusoïdale (battement d'un fouet). On peut distinguer, dans ce cas, un mouvement partant du corps cellulaire ou un mouvement partant de la pointe du flagelle ; les déplacements sont alors opposés. Le mouvement observé chez *Chlamydomonas* est spécial en ce sens qu'il s'agit d'un mouvement de brasse assuré pourtant par deux flagelles typiques.

• **Origine du mouvement dans l'axonème**. Le mouvement ciliaire ou flagellaire étant toujours lié à la flexion de l'axonème, il s'agit d'expliquer son origine. Plusieurs données expérimentales éclairent le mécanisme de la courbure : 1) un flagelle séparé du corps cellulaire continue de produire des ondulations normales pendant un certain temps, ce qui prouve qu'il existe un moteur interne au système, 2) un axonème isolé et purifié peut fonctionner *in vitro* si on lui fournit de l'ATP, et 3) un axonème traité de façon ménagée par une enzyme protéolytique, en présence d'ATP, s'allonge d'un facteur important en faisant glisser les uns par rapport aux autres, sur la presque totalité de leur longueur, les neuf doublets de microtubules qui le constituent. Ce dernier point s'explique par le fait que les différents types de liens qui les unissent les uns aux autres (comme la nexine) ont été rompus par la protéolyse.

Le mécanisme proposé pour l'origine du mouvement est le suivant : les bras de dynéine, qui ont une activité ATP asique à l'état isolé, fonctionnent comme des moteurs moléculaires semblables aux têtes de myosine, dans les sarcomères des fibres musculaires. Ils changent de conformation en fonction de leur liaison à l'ATP et de son hydrolyse : un cycle d'accrochage des bras au microtubule voisin, de basculement puis de libération provoque le déplacement relatif des doublets les uns par rapport aux autres. Le glissement des doublets, dans un cil intact où ces derniers sont accrochés au corpuscule basal, est évidemment transformé en une courbure (voir *figure* 11.17). La molécule de nexine, quant à elle, agirait à la manière d'un élastique qui empêcherait un glissement trop important des doublets les uns par rapport aux autres et favoriserait le retour à la position initiale.

3.5.3. Déplacement par reptation sur un substrat solide

Ce mouvement est typique des cellules fortement aplaties sur leur support, auquel elles sont susceptibles de s'accrocher par des points d'ancrage réversible. On peut, par exemple, décrire le déplacement des fibroblastes en culture, qui évoluent de manière saccadée à la vitesse de plusieurs dizaines de micromètres par heure, comme le montre la microcinématographie. La forme de ces cellules est très polarisée, avec une face frontale large et une zone caudale effilée (voir *figure* 11.18). La face frontale produit sans cesse de fins prolongements aplatis (0,1-0,4 µm d'épaisseur) très mobiles, appelés **lamellipodes**, qui portent souvent des épines rigides plus ou moins allongées (0,1 µm de diamètre ; 5-10 µm de long), rétractiles et dirigées vers l'avant : les **spicules**. Ces derniers contiennent un faisceau peu serré de plusieurs dizaines de microfilaments d'actine, dont l'extrémité (+) est tournée vers la membrane plasmique. Les **filopodes** sont des spicules très allongés (50 µm) rencontrés dans les cônes de croissance des axones des cellules nerveuses.

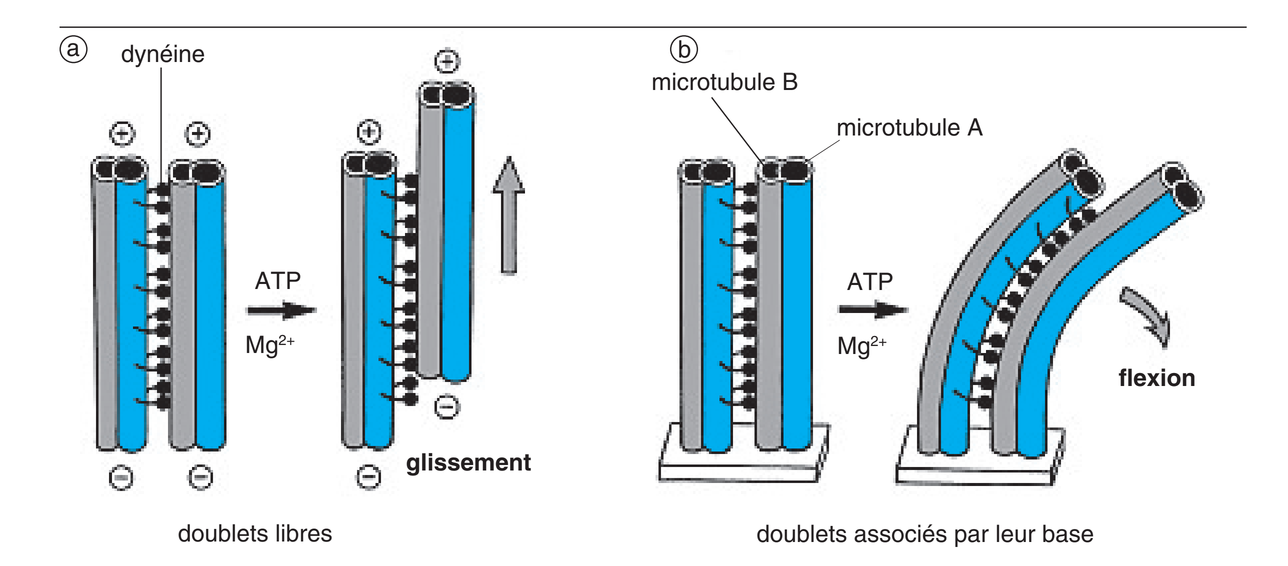


Figure 11.17

Principe de la courbure de l'axonème flagellaire *in vivo*

(a) glissement de deux doublets de microtubules adjacents, supposés libres de leurs mouvements (expérience *in vitro*) ; les têtes de dynéine se déplacent de l'extrémité (+) vers l'extrémité (–) grâce à l'hydrolyse de l'ATP ; **(b)** courbure des deux doublets fixés par leur extrémité (–) au sein de l'axonème, *in vivo* ; le mouvement des têtes de dynéine provoque ici la flexion de l'ensemble.

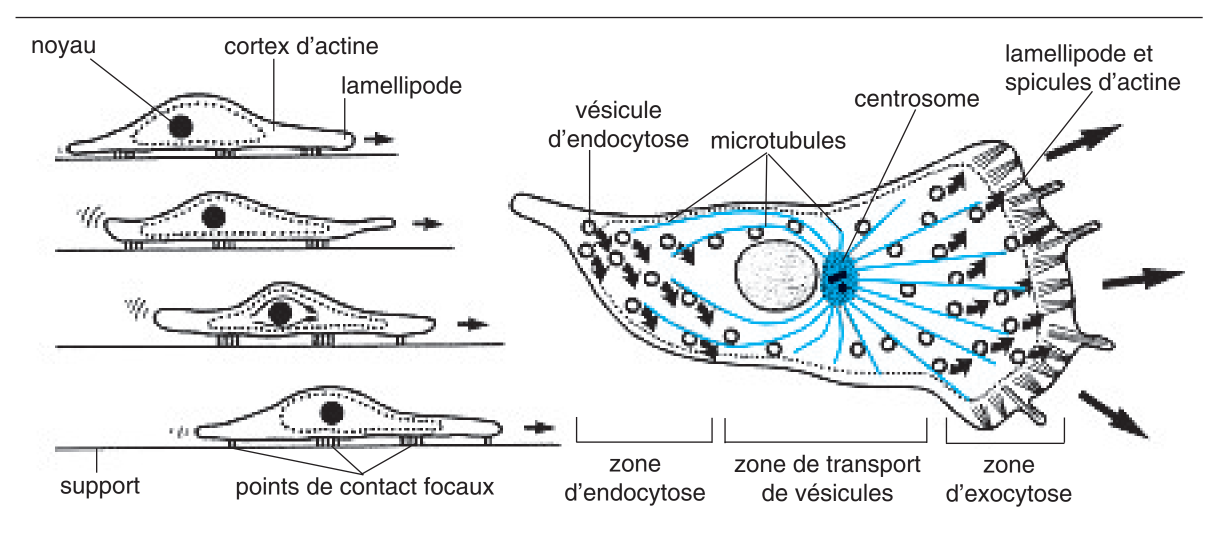


Figure 11.18

Déplacement par reptation d'un fibroblaste en culture

Selon le modèle présenté à droite, les microtubules servent de rails à des vésicules de sécrétion golgiennes ; cette disposition conduirait à un apport constant de matériel membranaire dans la région antérieure de la cellule, ce qui favoriserait son allongement, et donc le déplacement. Une endocytose compensatrice localisée dans la zone postérieure permettrait, de façon opposée, un raccourcissement de la cellule à ce niveau. (D'après B. Alberts et *al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*.)

La locomotion se produit de la façon suivante :

– les fins prolongements projetés par le bord avant de la cellule fonctionnent comme des antennes et semblent explorer et palper le support (rôle sensoriel). Si celui-ci remplit certaines conditions chimiques, ils sont susceptibles de se fixer de façon durable et ainsi d'orienter le mouvement du corps cellulaire ; si l'accrochage n'a

pas eu lieu, ces prolongements se rétractent ou bien sont renvoyés vers l'arrière de la cellule, sous forme d'ondulations, par la surface supérieure ;

– lorsque de nouvelles plaques d'adhérence au support sont formées dans la partie antérieure de la cellule, celle-ci est tractée vers l'avant par un raccourcissement global qui induit en conséquence un amincissement du cytoplasme postérieur (d'où l'aspect effilé de cette région appelée **fibre de rétraction**). La queue de la cellule se décroche du substrat, ou bien se déchire en laissant de petits lambeaux de cytoplasme porteurs de plaques d'adhérence, qui y restent collées.

Les mécanismes mis en jeu dans ces phénomènes impliquent l'actine, qui constitue la molécule majoritaire des divers prolongements cellulaires décrits plus haut. Un réseau tridimensionnel dynamique de microfilaments en train de se polymériser et de se dépolymériser selon le mode du tapis roulant, soutenu par des faisceaux plus ou moins serrés, permet la mobilité de ces structures et autorise l'accrochage au support. Celui-ci est assuré grâce à des protéines transmembranaires agissant comme des récepteurs qui, du côté extérieur identifient des composés du milieu et se lient à eux (la matrice extracellulaire, dans les conditions naturelles ; voir chapitre 14), et du côté intérieur, entrent en contact direct ou indirect avec les faisceaux de microfilaments des spicules. On possède de plus en plus de données sur les rapports existant entre membranes et extrémités (+) des filaments stables ou dynamiques d'actine, et de nombreuses protéines ont été localisées à ce niveau (par exemple, la villine). Dans le cas des filaments dynamiques, il faut imaginer une sorte de centre organisateur qui maintient le contact avec la membrane, tout en permettant l'allongement de ces derniers.

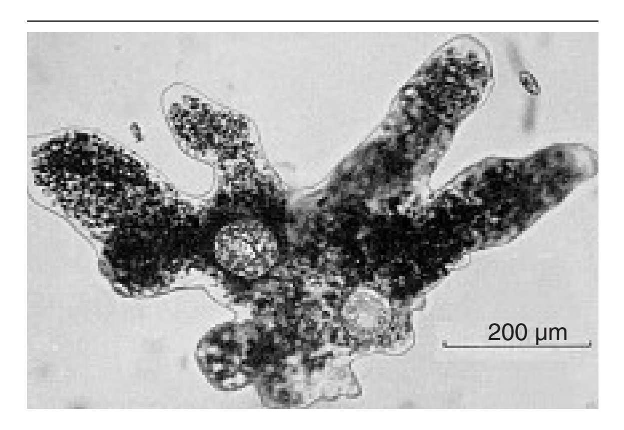
De nombreuses drogues sont connues pour interférer *in vitro* avec les processus d'autoassemblage de l'actine, comme la **cytochalasine** ou la **phalloïdine** (toutes deux extraites de Champignons). Elles entraînent l'arrêt complet du mouvement des fibroblastes, ainsi que celui d'autres processus tels que la phagocytose ou la cytodiérèse. Le premier composé se lie aux extrémités (+) des microfilaments dynamiques et entraîne ainsi leur dépolymérisation, tandis que le second les stabilise en se fixant tout autour d'eux. Les microfilaments stables, comme ceux du muscle ou des microvillosités, ne sont pas affectés par ces drogues.

Un cycle particulier d'endocytose et d'exocytose (voir chapitre 6) pourrait en outre jouer un rôle dans ce type de locomotion. Contrairement à ce qui se passe dans les cellules non polarisées, les vésicules d'exocytose semblent ici envoyées dans une région privilégiée de la cellule qui se déplace ; en effet, la disposition de l'appareil de Golgi (qui fournit ces vésicules), et celle du centrosome (qui nuclée les microtubules), ne sont pas quelconques (voir *figure* 11.18). Ces derniers sont situés près du noyau, sur la face avant de la cellule, et de nombreux microtubules sont dirigés, en éventail, vers la zone antérieure fine et élargie qui s'allonge. Il existerait ainsi un vaste flux de membrane dirigé de l'arrière vers l'avant de la cellule, et guidé par le cytosquelette.

3.5.4. Mouvement amiboïde

Ce type de mouvement est caractérisé par la projection continue, l'accrochage et la rétraction de volumineux prolongements, ou **pseudopodes**, qui sont émis vers le support et entraînent ainsi le déplacement des cellules. Les Amibes (Protistes parfois de grande taille) ou bien les macrophages (cellules sanguines des Vertébrés), par exemple, se déplacent en utilisant ce mécanisme particulier. Des études de microchirurgie montrent que deux régions peuvent être distinguées au sein du cytoplasme de ces cellules (voir *figure* 11.19). La base du mouvement se trouve dans la capacité que possède le cytoplasme de passer réversiblement d'un **état de gel** semi-rigide, à un état beaucoup plus fluide, dit **état de sol**.

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces changements de phase commencent à être bien connus. Ces cellules sont particulièrement riches en actine et en protéines qui se lient à celle-ci. Parmi ces dernières, on en a identifié plusieurs qui pourraient rendre compte du phénomène observé : la filamine et l'α actinine pontent *in vitro* les microfilaments les uns aux autres en formant un réseau tridimensionnel à consistance de gel ; à l'inverse, la gelsoline se fixe sur le flanc des microfilaments et les rompt, ce qui détruit le réseau et transforme un gel en un sol. L'action combinée de l'autoassemblage de l'actine et de ces protéines, dont les effets sont opposés, semble pouvoir expliquer la formation des pseudopodes. Comme dans la cyclose, il faut sans doute aussi faire intervenir la **minimyosine**, liée ici à la membrane plasmique.



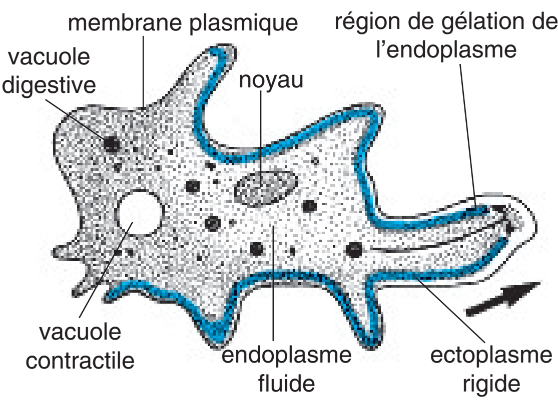


Figure 11.19

Mouvement amiboïde

Au sein du cytoplasme des amibes, on distingue une région centrale dont la consistance fluide et la richesse en organites sont semblables à celles du cytoplasme des cellules banales : l'**endoplasme**, et une région corticale (sous-membranaire), épaisse et dépourvue d'organites, ayant la consistance d'un gel : l'**ectoplasme**. Cette organisation se retrouve également dans les longs pseudopodes émis par la cellule, sauf à leur extrémité, qui est à l'état de sol et permet une sorte d'écoulement du cytoplasme fluide. Au cours de l'allongement, le cortex du pseudopode devient ensuite rigide.

Cette protéine est très abondante chez les amibes ; elle permet, grâce à sa tête qui se fixe réversiblement à l'actine, de faire glisser vers l'avant les microfilaments corticaux, par rapport à la membrane plasmique. On a enfin montré que divers facteurs, tels que le pH ou la concentration en ions Ca^{2+}, sont importants pour l'activité de ces molécules ; le détail des contrôles qui font que localement une masse de cytoplasme fluide s'allonge pour former un prolongement qui se rigidifie ensuite, reste cependant inconnu. De plus, il faut rendre compte du fonctionnement polarisé et directionnel de l'ensemble du système. Les drogues signalées plus haut inhibent aussi le mouvement amiboïde.

4. MOTILITÉ DES CELLULES PROCARYOTIQUES

Malgré leur petite taille, la simplicité de leur organisation cellulaire et l'absence de cytosquelette, de nombreux micro-organismes procaryotiques sont dotés de la capacité de se mouvoir par eux-mêmes, soit en phase liquide, soit sur un support. On distingue deux types de locomotion : 1) un mouvement lié à des structures spécialisées, qui peuvent être des flagelles ou des filaments axiaux disposés le long du corps cellulaire, et 2) un mouvement de glissement sur un support solide, dont le mécanisme reste encore largement inconnu. Seul le mouvement flagellaire, qui se distingue fondamentalement de celui décrit chez les Eucaryotes, sera détaillé ici, en raison de l'originalité du mécanisme mis en œuvre.

4.1. Diversité des types de disposition flagellaire

4.1.1. Mise en évidence des flagelles bactériens

En raison de la finesse de ces appendices (10 à 20 nm de diamètre), leur observation directe au microscope optique est impossible. Il existe cependant divers protocoles de visualisation, qui consistent à épaissir artificiellement le diamètre des flagelles en adsorbant à leur surface des composés colloïdaux, ce qui les rend alors colorables et bien visibles (voir *figure* 11.20). La meilleure façon de mettre en évidence les flagelles est néanmoins la microscopie électronique, grâce aux méthodes directes et rapides que sont l'ombrage métallique ou la coloration négative (voir chapitre 3). Cette dernière technique donne des images très fines et permet de visualiser leur organisation moléculaire ; ceux-ci apparaissent formés de plusieurs protofilaments élémentaires parallèles, d'aspect voisin de celui des microtubules des cellules eucaryotiques. On observe de plus que les flagelles traversent la paroi de la cellule et sont directement ancrés dans la membrane plasmique, au sein d'un dispositif très complexe (voir plus loin).

4.1.2. Nombre et disposition des flagelles

Ces critères servent depuis longtemps à l'identification systématique (taxonomie) des souches

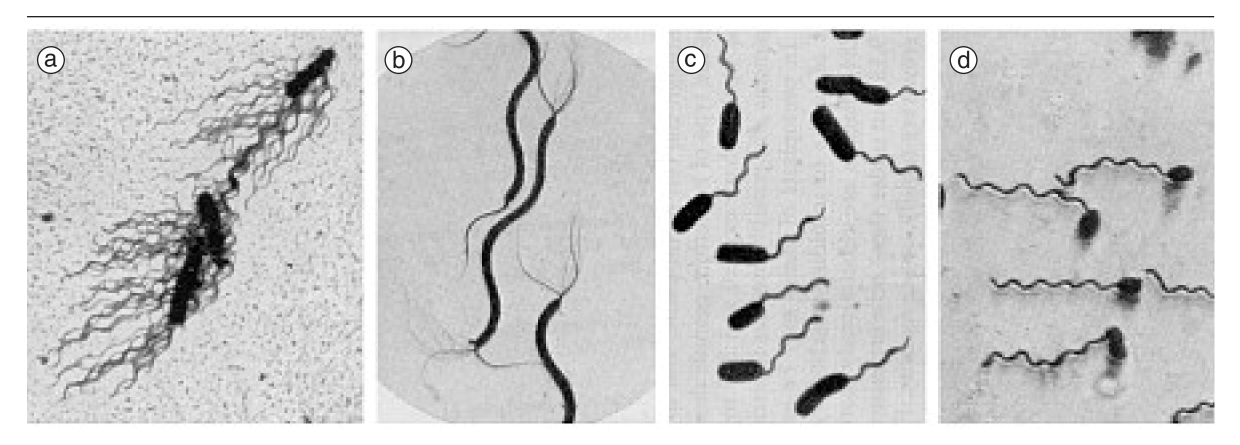


Figure 11.20

Mise en évidence des flagelles bactériens en microscopie photonique

Ces structures apparaissent sous forme de fins filaments sinueux, souvent bien plus longs que le corps bactérien lui-même, et atteignant parfois 20 µm de long. Le nombre, la taille et la disposition des flagelles sont caractéristiques de l'espèce étudiée. Cellules de : **(a)** Clostridium ; **(b)** Spirillum ; **(c)** et **(d)** Pseudomonas (× 2 000).

bactériennes. Certaines espèces ne portent qu'un seul flagelle, ou un nombre limité de flagelles, sous forme d'une touffe, soit à une extrémité, soit aux deux extrémités de la cellule qui est en général allongée ; on parle alors de d'**insertion polaire**. Celle-ci se distingue de l'**insertion** dite **péritriche**, dans laquelle tout le corps cellulaire est recouvert d'un grand nombre de flagelles, comme c'est le cas pour l'espèce bien connue *Escherichia coli*.

4.2. Structure et fonctionnement des flagelles bactériens

Comme le laisse prévoir leur diamètre, l'organisation et le fonctionnement de ces longs prolongements n'ont rien de comparable avec ceux des flagelles eucaryotiques.

4.2.1. Organisation des flagelles bactériens

Les flagelles bactériens peuvent être isolés par centrifugation, après une agitation mécanique violente des cellules qui les sépare des corps cellulaires. L'électrophorèse montre qu'ils sont formés d'une seule espèce protéique globulaire, la **flagelline**, d'une masse moléculaire voisine de 40 kDa. Plusieurs dizaines de milliers de ces sous-unités s'organisent pour former une structure tubulaire stabilisée seulement par des liaisons faibles. Un flagelle doit donc être considéré comme une unique et énorme molécule présentant une structure quaternaire de type polymérique. Les protofilaments constituant les génératrices du tube flexible obtenu sont, comme dans les microtubules eucaryotiques, polarisés et légèrement décalés les uns par rapport aux autres. La polymérisation et l'autoassemblage *in vitro* des flagelles bactériens se réalisent spontanément à partir de solutions concentrées de flagelline, dans certaines conditions expérimentales (salinité élevée, en particulier).

4.2.2. Moteur rotatif et mouvement du flagelle

À la différence des cils ou des flagelles eucaryotiques, un flagelle bactérien isolé est totalement et irréversiblement inerte. Le fait qu'il ne batte pas seul montre qu'il ne possède pas de moteur interne, ce qui est à rapprocher sans aucun doute de la simplicité de son organisation. Le mouvement de cette structure trouve son origine dans un moteur rotatif situé au niveau de la membrane plasmique de la cellule. Ce dispositif d'une extrême complexité, qui constitue une exceptionnelle « micromachine », comprend un rotor et un stator permettant à un bras coudé de tourner à grande vitesse, dans un sens ou dans l'autre ; ce bras entraîne le mouvement du flagelle qui lui est accroché, à la manière d'un fouet. Le mouvement de rotation assuré par ce moteur est à l'origine du déplacement bactérien, à une vitesse de 10 à 20 µm

par seconde. Le gradient transmembranaire de protons fournit, selon un mécanisme mal connu, l'énergie nécessaire à la production du travail accompli (voir *figure* 11.21).

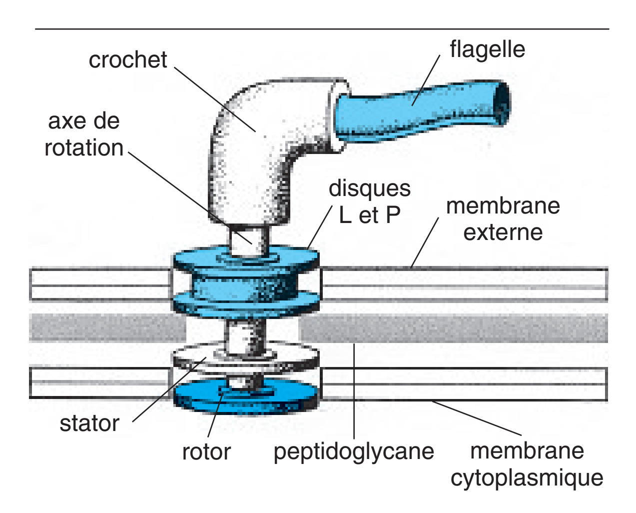


Figure 11.21

Schéma illustrant l'organisation du moteur rotatif d'un flagelle de E. coli

Le fouet du flagelle est relié au moteur par un crochet à angle droit, qui est extracellulaire. La partie basale du moteur est constituée de deux disques faisant office de stator (fixe, et associé au peptidoglycane) et de rotor (en couleur). Ce dernier tourne à la vitesse de 100 tours par seconde au sein de la membrane plasmique. Les deux disques supérieurs notés L et P permettent à l'axe de rotation de traverser la membrane externe (cas des Eubactéries Gram négatives).

4.2.3. Coordination du mouvement et chimiotactisme

Chez *E. coli* ou *Salmonella*, on a observé que, suivant le sens dans lequel tourne le moteur flagellaire, le comportement des flagelles est différent, ainsi que le type de mouvement assuré. Si celui-ci tourne dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, les flagelles se rassemblent à l'arrière de la cellule en un faisceau serré qui propulse efficacement le corps cellulaire ; s'il tourne dans le sens opposé, les flagelles se répartissent dans toutes les directions de l'espace et la cellule ne progresse plus mais tournoie sur elle-même. La progression de ces Bactéries est donc une succession de longues phases de mouvement linéaire et de courtes phases d'arrêt et de pivotement, au cours desquelles elles changent de direction.

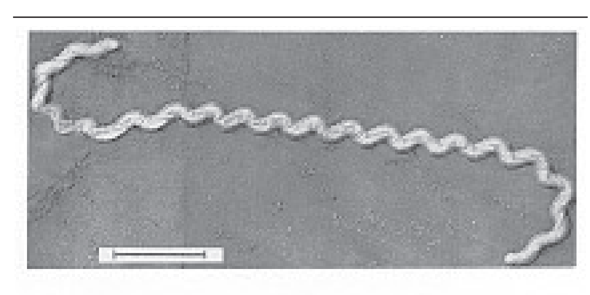
Malgré la simplicité de leur organisation et de leur métabolisme, les Bactéries sont capables de chimiotactisme, c'est-à-dire de déplacement orienté dans un gradient chimique. La nage normale des cellules est, en effet, affectée par des substances attractives ou répulsives qui agissent en modifiant la fréquence des pivotements, et en augmentant ou en diminuant ainsi la durée des phases de progression linéaire (en direction ou à l'opposé de la source de substance). Le mécanisme moléculaire de ce phénomène a été analysé grâce à divers mutants présentant un chimiotactisme défectueux ; il est basé sur l'existence de récepteurs protéiques liés à la membrane cytoplasmique, qui reconnaissent et fixent certains composés chimiques (acides aminés, sucres…). Cette fixation conduit à la production d'un signal intracellulaire qui détermine la nature du mouvement du flagelle ; ce mécanisme est bien trop sophistiqué pour pouvoir être décrit ici. On peut cependant prendre la mesure de la pression de sélection et de la puissance des phénomènes évolutifs qui ont permis de faire apparaître un processus aussi élaboré chez des organismes en apparence simples ; cette simplicité est bien le signe d'un état très évolué et non pas d'un état primitif (voir chapitre 16) !

4.3. Autres types de déplacement chez les Bactéries

4.3.1. Organisation et fonctionnement des filaments axiaux des spirochètes

Ces structures locomotrices spécialisées sont spécifiques du groupe des **Spirochètes** ; ces Bactéries sont caractérisées par un corps cellulaire très allongé et en forme d'hélice ou de tire-bouchons, auquel une paroi fine et flexible confère une grande mobilité. Chaque extrémité de la cellule porte une touffe de nombreux filaments analogues à des flagelles, qui ne sont pas libres et dirigés vers l'extérieur, comme c'est le cas habituellement, mais qui restent enfermés sous la paroi cellulaire. Ces deux paquets de fibres serrées se rejoignent au milieu du corps cellulaire, formant un câble épais et continu (le **filament axial**) passant par l'axe de l'hélice que celui-ci représente (*figure* 11.22).

Les cellules de ce genre se déplacent dans un milieu liquide en se déformant par courbure ou repliement (tout en conservant leur structure hélicoïdale), un peu à la manière d'un ver qui se tortille. Le mécanisme original invoqué est le raccourcissement global du corps cellulaire grâce au raccour-



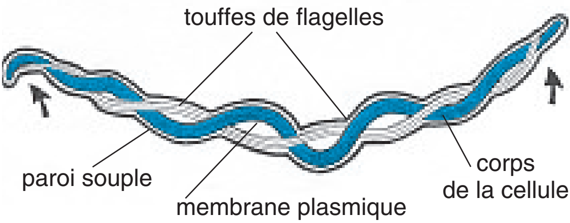


Figure 11.22

Photo et schéma montrant l'organisation d'une cellule de Spirochète et de son appareil locomoteur

Les deux touffes de flagelles, enfermées sous la paroi souple de la cellule, sont insérées à chaque extrémité (flèches) du corps cellulaire, représenté en couleur. La photographie montre une cellule observée au microscope électronique (coloration négative ; la barre représente 10 µm). D'après J.-P. Regnault, Décarie-Vigot (Microbiologie Générale), et cliché Labo. BG, Orsay.

cissement du filament axial lui-même, dont les deux groupes de fibrilles opposées se déplaceraient par glissement l'un par rapport à l'autre.

4.3.2. Glissement

Les **Cyanobactéries**, qui se présentent parfois sous la forme de longs filaments multicellulaires simples et rigides, sont mobiles par glissement sur leur support. Le genre *Oscillatoria*, par exemple, tire son nom du phénomène de balancement caractéristique de ses filaments, bien visible au microscope. La paroi des cellules qui les constituent est épaisse et rigide et aucune structure à fonction locomotrice évidente ne peut être cytologiquement mise en évidence, de sorte que le mécanisme du mouvement reste inconnu chez ces organismes. Un autre groupe de Bactéries, dont les cellules vivent en général isolées : les **Myxobactéries**, pratiquent aussi le glissement sur un support. Leur paroi mince et la flexibilité de leur corps cellulaire sont sans doute en rapport avec ce mode de locomotion, mais aucune structure cellulaire différenciée qui pourrait en être responsable n'est visible ici aussi.

Perspective biomédicale

La myopathie de Duchenne

Les myopathies sont des maladies génétiques caractérisées par une perte progressive des fonctions des cellules musculaires. La dystrophie musculaire de Duchenne, décrite en 1860, est la forme la plus fréquente et la plus sévère ; cette affection dégénérative, récessive et liée au sexe, touche un individu mâle sur 3500. Un dysfonctionnement moteur et une faiblesse musculaire progressifs se manifestent à partir de l'âge de trois à cinq ans. Dès lors, la perte des fonctions musculaires ne cesse de s'aggraver, et les enfants d'une dizaine d'années sont condamnés au fauteuil roulant. La mort, inéluctable, survient aux environs de vingt ans, en raison de déficiences des muscles respiratoires et cardiaque.

Le gène responsable de cette anomalie est porté par le chromosome X ; il a été cloné en 1986. Il s'agit d'un des plus grands gènes connus (2300 kbases et 73 exons) ; l'analyse de sa séquence montre qu'il code une protéine de 427 kDa : la dystrophine. C'est une très grosse protéine fibreuse, qui est produite dans tous les types de cellules musculaires : cardiaques, squelettiques et lisses. Elle fait partie de la famille de l'actinine et des spectrines ; intervenant sous forme de dimère antiparallèle, elle se lie à l'actine, comme elles, par ses domaines terminaux.

La dystrophine est, d'une part, accrochée à un gros complexe glycoprotéique enchâssé dans la membrane plasmique de la cellule musculaire et, d'autre part, aux microfilaments d'actine corticaux qu'elle ponte en un réseau serré. Le complexe transmembranaire étant lui-même accroché à la matrice extracellulaire (lame basale), le cytosquelette intracellulaire est donc connecté à celle-ci via ce dispositif.

La dystrophine représente 5 % des protéines associées à la face interne de la membrane des myocytes. Elle est concentrée à l'endroit où les stries Z (qui marquent les limites des sarcomères, et sur lesquelles l'actine est fixée) entrent en contact avec la membrane plasmique. En accrochant l'actine à la face interne de celle-ci, elle a un rôle d'arrimage de la machinerie contractile des sarcomères à cette membrane. De ce fait, l'ancrage dans la lame basale consolide la cellule musculaire et lui permet de résister aux déformations dues à la contraction.

L'étude moléculaire des diverses formes mutées du gène géant de la dystrophine montre que 55 % des anomalies sont des délétions, 40 % des mutations ponctuelles et 5 % des duplications. Dans le cas de la myopathie de Duchenne, la dystrophine est totalement absente ; dans une forme rare de myopathie moins sévère (dystrophie musculaire de Becker), la protéine est produite, mais plus ou moins altérée, et les sujets atteints ont une vie presque normale.

Chez les malades n'ayant pas de dystrophine, la membrane, qui n'est plus renforcée par son cytosquelette cortical, est plus aisément endommagée par les contractions musculaires répétées. La perte de cytoplasme des myocytes fragilisés qui en découle est attestée par la « fuite » d'une enzyme spécifique du muscle : la créatine kinase, qui se retrouve dans le sang à des concentrations 50 fois supérieures à la normale. L'atrophie musculaire inexorable est liée à cette nécrose cellulaire progressive. Actuellement, il n'existe pas de traitement pour cette maladie.

La réalisation de sondes moléculaires permet de détecter la mutation chez les individus à risque ; seuls le diagnostic prénatal et le conseil génétique autorisent une approche préventive. Cependant, on sait qu'un tiers environ des cas de myopathie n'a pas une origine héréditaire et résulte de mutations spontanées, non prédictibles, ce qui limite l'efficacité de la démarche. La thérapie génique est la seule perspective curative possible, en restaurant l'expression du gène dans les cellules musculaires, ou bien en stimulant l'expression de protéines ayant une fonction voisine de celle de la dystrophine, afin de compenser son absence.

L'étude de la myopathie de Duchenne et l'identification de la dystrophine illustrent parfaitement ce qu'on appelle désormais la génétique inverse.

Résumé

Le cytoplasme des cellules eucaryotiques est sillonné par plusieurs types de structures fibreuses ou tubulaires qui participent à la fois à son architecture et à sa dynamique. Trois réseaux sont identifiables en microscopie électronique et en immunofluorescence chez les cellules animales ; ils sont formés des structures élémentaires nommées : microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires. Les cellules végétales sont dépourvues des derniers cités.

Les microtubules sont en général constitués de treize protofilaments, eux-mêmes formés de dimères d'une protéine globulaire : la tubuline. Ces édifices résultent d'un autoassemblage spontané analysable *in vitro*. Leurs propriétés *in vivo* sont décrites par le modèle dit d'instabilité dynamique, qui résulte du fait qu'une extrémité des microtubules est bloquée dans des structures nommées centres organisateurs. De nombreuses protéines s'associent aux microtubules et leur permettent de former des faisceaux ou des édifices complexes tels que les centrioles ou les axonèmes des cils.

Les microfilaments sont formés de monomères globulaires d'actine ; leurs propriétés d'autoassemblage sont voisines de celles des microtubules, mais *in vivo*, c'est le modèle dynamique du tapis roulant qui est mis en œuvre. Diverses protéines s'associent aux microfilaments pour leur permettre de former des câbles, les protéger ou aider à leur désagrégation, les accrocher aux membranes cellulaires ou bien assurer un phénomène de glissement, comme c'est le cas avec la myosine.

Les filaments intermédiaires sont formés de molécules fibreuses qui s'organisent spontanément en câbles épais présentant des propriétés de stabilité structurale et chimique radicalement différentes de celles décrites pour les deux systèmes cytosquelettiques précédents. On les trouve dans les cellules animales différenciées où ils jouent un rôle évident d'échafaudage et participent à l'architecture cellulaire.

Le cytosquelette intervient aussi bien dans la constitution d'édifices stables (centrioles, microvillosités, jonctions intercellulaires, etc.), que dans celle de structures dynamiques associées aux mouvements cellulaires. Avec l'aide de moteurs moléculaires, les microtubules permettent le déplacement de divers organites au sein des cellules ; associés aux différentes formes de myosine, les microfilaments sont à l'origine du mouvement dans les cellules banales ou les cellules spécialisées (fibres contractiles). La cyclose permet le brassage du cytoplasme autour de la vacuole centrale de certaines cellules végétales. Ce mouvement en masse est lié à la présence d'un réseau cortical d'actine le long duquel des sacs de réticulum endoplasmique se déplacent par l'intermédiaire de protéines de liaison à l'actine.

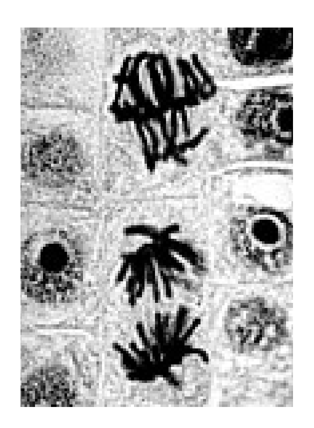
Grâce à leurs microtubules, capables de glisser les uns par rapport aux autres, les cils et les flagelles peuvent onduler et être à l'origine du mouvement des cellules isolées. La reptation sur un milieu solide et le mouvement amiboïde font aussi intervenir le cytosquelette. Dans le premier cas, on évoque, outre l'intervention de l'actine, le rôle d'un flux de membrane de la partie postérieure de la cellule vers sa partie antérieure. Dans le deuxième cas, la minimyosine associée à la membrane plasmique joue un rôle capital, en même temps que la transformation réversible de l'état du cytoplasme (gel-sol).

La motilité de la plupart des cellules bactériennes est assurée par un ou plusieurs flagelles dont l'organisation est très simple, en comparaison de celle des Eucaryotes. Leur mouvement est dû à un moteur moléculaire situé dans la membrane plasmique, qui permet sa rotation et entraîne ainsi la propulsion de la cellule. Un mouvement de glissement, dont le mécanisme reste inconnu, est décrit chez certaines Bactéries (les Cyanobactéries, en particulier). Enfin, l'intervention de structures particulières, nommées filaments axiaux, permet la déformation du corps cellulaire et le déplacement des Bactéries du groupe des Spirochètes.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Décrire l'organisation des microtubules, des microfilaments et des filaments intermédiaires, tels qu'on les observe en microscopie électronique.
2. Pourquoi l'immunofluorescence indirecte est-elle une technique plus performante et intéressante que l'immunofluorescence directe ?
3. Comment se présentent les trois réseaux cytosqueletiques des cellules animales lorsqu'on observe des cellules entières traitées par l'immunofluorescence ?
4. Décrire l'organisation moléculaire des microtubules. Comment appelle-t-on la propriété fondamentale qui préside à leur formation *in vitro* ou *in vivo* (propriété commune aux autres réseaux cytosquelettiques) ?
5. Quelles sont les différences existant entre le mécanisme dit du «tapis roulant» et celui nommé «instabilité dynamique» ?
6. Citer les principales catégories de protéines associées aux microfilaments et décrire les propriétés importantes qu'elles confèrent à ces derniers.
7. Décrire l'organisation moléculaire d'un filament intermédiaire.
8. Pourquoi peut-on dire que les filaments intermédiaires forment des édifices structuralement et chimiquement stables ? dans quels types de cellules les trouve-t-on ?
9. Avec quelles structures membranaires cytologiquement bien identifiées les filaments intermédiaires entrent-ils en contact direct ?
10. En quoi la technique des hybridomes constitue-t-elle un progrès considérable par rapport à la méthode classique de production des anticorps polyclonaux ?
11. Nommer et décrire les structures stables construites à partir des microtubules.
12. Même question pour les microfilaments.
13. Dans quels modèles biologiques les mouvements des organites liés au cytosquelette ont-ils été particulièrement bien étudiés ?
14. Quelles interactions existent entre les microtubules et les autres éléments du cytosquelette ou certains organites typiques ?
15. Qu'appelle-t-on moteur moléculaire ? donner des exemples de ces moteurs et préciser leur lieu d'action au niveau du cytosquelette.
16. Rappeler les caractéristiques principales des fibres musculaires striées et énoncer le principe de leur contraction à l'échelle moléculaire.
17. Qu'est-ce que la cyclose ? dans quels types de cellules peut-on l'observer ? quels mécanismes invoque-t-on pour expliquer ce phénomène ?
18. Quelle est la structure de l'axonème ciliaire ? quels sont les mécanismes moléculaires à l'origine du mouvement de courbure qui le caractérise ?
19. Décrire les mécanismes cellulaires et moléculaires invoqués pour expliquer le mouvement de reptation d'une cellule animale sur son support.
20. Donner le nom et décrire le mode d'action de quelques drogues qui perturbent le fonctionnement des microtubules et des microfilaments.
21. En quoi le mouvement amiboïde diffère-t-il de la reptation sur un support ?
22. Décrire l'organisation et le fonctionnement d'un flagelle bactérien. Comparer le mécanisme de son mouvement à celui d'un flagelle eucaryotique.



Chapitre 12

PROLIFÉRATION DES CELLULES. Aspects moléculaires et cellulaires de la division

De toutes les propriétés caractérisant les êtres vivants, la plus manifeste et la plus fascinante est certainement la reproduction ; l'observation banale montre que tous les organismes, simples ou complexes, donnent naissance à des organismes ayant des caractéristiques morphologiques, anatomiques et physiologiques identiques aux leurs. Cependant, comme tous sont constitués de cellules, et que chacune d'elles dérive d'une cellule préexistante, ce processus doit d'abord être analysé à son échelle, à celle de ses organites, et évidemment à celle du matériel génétique qui contient le programme permettant sa construction (voir chapitres 2 et 4). La reproduction cellulaire est donc à la base de toute reproduction, qu'elle concerne les êtres pluricellulaires ou pas, et qu'elle intervienne dans la reproduction sexuée ou pas. En raison de cette position centrale, elle présente une importance et une signification biologique très variables selon les cycles de vie des organismes.

La propriété fondamentale de l'information génétique est sa capacité à se reproduire fidèlement, afin que soit assurée sa continuité dans le temps. Les cellules-filles issues de la division d'une cellule-mère héritent ainsi d'un programme leur conférant une probabilité de survie à court terme et des propriétés fonctionnelles équivalentes à celles de la génération précédente. De même que pour l'expression du matériel génétique, les mécanismes moléculaires mis en oeuvre dans la réplication de l'ADN sont très semblables chez les Procaryotes et les Eucaryotes. Les modalités du partage de ce matériel génétique entre cellules-filles, après sa duplication, sont en revanche beaucoup plus complexes chez les seconds que chez les premiers. Ceci s'explique par le fait que la quantité d'information génétique et son organisation générale sont très différentes chez ces deux groupes d'êtres vivants (voir chapitres 4 et 8).

L'ADN est une molécule fragile, sensible à la fois à des agressions internes à l'organisme lui-même, ou à celles issues de son environnement ; les processus de réplication conduisent en outre à de rares, mais inévitables erreurs. Les conséquences des modifications chimiques de l'ADN sont potentiellement désastreuses pour les cellules et les organismes, à la fois à court terme et à long terme. En effet, les altérations spontanées ou provoquées, ainsi que les erreurs de réplication, conduisent au blocage des processus de réplication ou de transcription et, de plus, elles induisent des mutations.

On distingue différents types de divisions cellulaires selon leurs manifestations cytologiques et les conséquences génétiques auxquelles elles conduisent pour les cellules-filles. Chez les unicellulaires, on parle de **scissiparité** lorsque la division ne met visiblement pas en oeuvre de mécanisme spécialisé, et repose uniquement sur la simple coupure en deux parts égales (bipartition) de tous les constituants cellulaires, puis de la cellule elle-même. C'est le cas chez tous les Procaryotes et quelques Eucaryotes (Protistes, Algues et Champignons unicellulaires) dont le noyau semble

simplement s'étirer et se pincer, en même temps que le cytoplasme se divise. En revanche, chez la plupart des Eucaryotes, des modifications structurales profondes affectent à la fois le noyau et le cytoplasme lors de la division ; bien que présentant de nombreux mécanismes en commun, nous distinguerons deux types de divisions cellulaires : la **mitose** et la **méiose**, en fonction de leurs répercussions génétiques chez les cellules-filles.

1. LES DIVISIONS CELLULAIRES DANS LE MONDE VIVANT

1.1. Mitose et méiose chez les Eucaryotes

Chez les Eucaryotes, les divisions mises en œuvre pour la simple multiplication des êtres unicellulaires, ou celles impliquées dans la construction du corps des Animaux ou de l'appareil végétatif des Végétaux et des Champignons, donnent naissance à des cellules génétiquement identiques. Ce type de division conforme (conservatrice de l'information génétique) est appelé **mitose**, et c'est elle que nous étudierons essentiellement dans ce chapitre. Seule l'exploitation différentielle des divers gènes du génome conduit à la réalisation des quelques 200 types cellulaires trouvés chez les Animaux supérieurs et des 20 à 25 types cellulaires des Végétaux supérieurs (voir les chapitres 8 et 14). La mitose peut s'effectuer chez n'importe quelle cellule eucaryotique, quelle que soit la structure de son génome ; en d'autres termes, le niveau de ploïdie (haploïdie, diploïdie, polyploïdie) n'intervient pas.

En revanche il existe, chez la plupart des Eucaryotes, un deuxième type de division cellulaire qui est associée au phénomène de reproduction sexuée et se réalise sur des cellules nécessairement diploïdes : la méiose. Celle-ci a une signification totalement différente puisqu'elle est à l'origine (à la suite de deux divisions successives qui s'enchaînent après un seul doublement du matériel génétique) de 4 cellules haploïdes génétiquement différentes entre elles, et différentes de la cellule initiale. On rappelle que c'est grâce aux mécanismes dits du **brassage interchromosomique** et du **brassage intrachromosomique** (*crossing-over*), que la méiose est responsable de la variabilité génétique des populations, ce qui favorise leur évolution ; voir l'encart suivant. L'ordre dans lequel interviennent les événements de la méiose et de la fécondation et la durée relative des phases haploïde et diploïde, sont à l'origine de toute la diversité des types de cycles de reproduction sexuée rencontrés chez les Eucaryotes.

La prophase de la première division de la méiose est originale, car beaucoup plus longue et plus complexe que celle d'une mitose ; elle est divisée en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Pendant cette prophase I, et en même temps qu'ils s'individualisent et se raccourcissent, les chromosomes homologues (caractéristiques de toute cellule diploïde) se rapprochent, s'accolent ensuite sur toute leur longueur (on parle de bivalents), puis commencent à se séparer. La métaphase I voit la mise en place, sur le plan équatorial, des n paires de chromosomes homologues en voie de séparation, déjà clivés en deux chromatides sœurs. À l'issue de cette première division, chaque cellule hérite donc d'un lot de n chromosomes homologues. La deuxième division de méiose, qui s'effectue sur des cellules déjà haploïdes, consiste simplement dans la séparation complète des deux chromatides de chaque chromosome dupliqué et dans leur répartition dans les deux cellules-filles (4 en tout).

COMMENTAIRE

Méiose et brassage des gènes

Mécanisme chromosomique compensateur de la fécondation au cours du cycle de vie des organismes à reproduction sexuée, la méiose est d'abord un mécanisme générateur de diversité génétique grâce à deux types de brassage des gènes, qui agissent simultanément, et dont le résultat global constitue la « recombinaison génétique ».

Le brassage interchromosomique est lié à la simple disposition des bivalents sur le plan équatorial, en métaphase de première division, qui met en place aléatoirement les chromosomes homologues paternels et maternels de façon quelconque, d'un côté ou de l'autre du plan. Ce phénomène contribue donc à réassortir, dans les quatre cellules issues de la méiose, les chromosomes d'origine paternelle et maternelle. Le nombre de combinaisons différentes obtenues par ce phénomène lié au seul hasard est fonction du nombre n de paires (2 à la puissance n) ; chez l'Homme, on a ainsi plus de

8 millions de possibilités d'associer les 23 chromosomes dans les gamètes !

Le brassage intrachromosomique est lié à l'accolement étroit des deux homologues (déjà dupliqués) au cours des stades zygotène et pachytène de la prophase I. À ce moment-là, il se produit des échanges de matériel génétique entre les chromatides non sœurs, au niveau de zones équivalentes et portant la même information génétique. Ce processus, qui est appelé «crossing-over», se manifeste cytologiquement par des figures caractéristiques de «croisement de chromatides», que l'on nomme chiasmas, au stade diplotène. De façon très schématique, on peut considérer que des chromatides homologues se cassent en des endroits équivalents et se «recollent» de manière erronée. Cet événement peut se produire en plusieurs endroits, simultanément, le long d'un même chromosome.

Des segments chromosomiques (et donc des gènes) d'origine paternelle peuvent ainsi être associés à des chromosomes maternels, et inversement. Si les formes de ces gènes étaient initialement différentes (allèles), on comprend comment ce processus réalise un brassage génétique à l'intérieur des molécules d'ADN.

1.2. Rôles des divisions chez les êtres unicellulaires

La division est le seul mode de reproduction des unicellulaires ; chez ces organismes fortement inféodés à leur environnement et très dépendants des sources alimentaires, elle constitue un moyen de colonisation rapide des milieux. La stratégie évolutive développée par la plupart des Procaryotes (au moins les formes libres) est basée : 1) sur une croissance et une multiplication rapides conduisant à de très grands effectifs, lorsque les conditions sont favorables, et 2) sur le maintien d'un génome haploïde. Ces deux conditions permettent aux nombreuses mutations apparues dans la population de s'exprimer immédiatement, ce qui conduit à une sélection instantanée des génotypes les plus adaptés lors d'un changement de milieu. On retrouve cette stratégie chez de nombreux micro-organismes eucaryotiques tels que les Protistes ou la levure, à la différence près que ces derniers ont «inventé» la reproduction sexuée, dont nous avons rappelé brièvement les avantages considérables.

1.3. Rôles des divisions chez les êtres pluricellulaires

Nous verrons dans le chapitre 14 que la spécialisation des cellules et leur organisation en tissus a permis aux organismes pluricellulaires l'acquisition d'une certaine indépendance vis-à-vis des conditions physico-chimiques changeantes du milieu environnant. La contrepartie a été la nécessité de contrôler à la fois des processus de différenciation et de prolifération de cellules qui descendent toutes d'une cellule unique, l'œuf, point de départ de tout Métazoaire ou Métaphyte. On peut distinguer, chez ces derniers, plusieurs catégories de divisions, selon la place quelles occupent dans leur cycle de vie.

1.3.1. Divisions de développement et de croissance

Les divisions interviennent à deux niveaux au cours du développement des organismes pluricellulaires. Dans l'embryon animal, à travers les stades de **segmentation** (où les cellules gardent un caractère indifférencié), elles font passer du stade œuf au stade fœtus ou larve, qui sont des formes déjà très organisées ; les tissus variés se différencient peu à peu, la morphogenèse met en place les organes, les corrélations intercellulaires nerveuses ou hormonales s'installent. Dans une deuxième phase, en simplifiant, les divisions cellulaires assurent la croissance des ébauches de l'être miniature élaboré précédemment, jusqu'à atteindre le stade adulte ; on peut rappeler à ce sujet l'exemple classique de la multiplication des chondrocytes et de la croissance du cartilage. Des phénomènes semblables peuvent être décrits au cours du développement des Végétaux supérieurs.

1.3.2. Divisions chez les Animaux ou les Végétaux adultes

Chez les Animaux adultes, la croissance est en général arrêtée (bien que l'on connaisse quelques groupes, tels que les Crustacés ou les Poissons, où elle se poursuit toute la vie) ; ceci ne veut pas dire que les divisions y sont complètement arrêtées, car

un certain nombre de tissus qui les constituent sont en constant renouvellement : cellules sanguines, épithéliums, cellules sexuelles, etc. Ce processus est réalisé grâce à des **cellules-souches** ; chez l'Homme, qui possède environ 5.10^{13} cellules, on calcule que 10^{6} cellules se divisent par seconde, à tout instant. Par ailleurs, les cellules différenciées de divers organes (foie, pancréas) conservent une certaine aptitude à se multiplier, bien que faiblement, et permettent ainsi leur entretien (voir chapitre 14). Chez les Insectes ou les Nématodes, en revanche, les cellules de l'adulte ne se multiplient plus, sauf celles à l'origine des gamètes.

La multiplication cellulaire est également liée à la **réparation des tissus endommagés** et à la **régénération** des organes chez divers organismes. À côté du processus de cicatrisation, on connaît des exemples de tissus dans lesquels des cellules à caractère embryonnaire sont «mises en réserve», au milieu des cellules différenciées elles-mêmes incapables de se diviser ; c'est le cas des **myoblastes** (cellules-satellites) situés au sein des muscles striés squelettiques des Vertébrés, qui peuvent se remettre à proliférer et participent à la réparation des parties lésées du tissu. La régénération est un phénomène fréquent chez de nombreux Animaux ; on en décrit des exemples chez les Echinodermes, les Planaires, les Insectes inférieurs, les Amphibiens Urodèles, etc. (voir chapitre 14). La multiplication cellulaire est enfin associée à la **reproduction asexuée** que l'on observe couramment chez les Spongiaires, les Cnidaires, les Annélides, les Cestodes, etc., grâce à des phénomènes de bourgeonnement ou de prolifération localisée.

Le cas des plantes supérieures est un peu différent puisque la morphogenèse et la croissance y sont continues pendant toute la vie, en particulier chez les plantes pérennes. Ces fonctions y sont assurées par les méristèmes caulinaires et racinaires, tant primaires que secondaires. Ces tissus à caractère embryonnaire assurent une croissance indéfinie en longueur et en épaisseur des tiges et des racines (mais les arbres meurent aussi !). Nous verrons dans le chapitre 14 que les cellules végétales conservent en général une forte aptitude à la dédifférenciation, à la prolifération et à la régénération de plantes entières (totipotence), ce qui conduit, d'une part, à de grandes possibilités de **multiplication végétative** naturelle et à toutes les pratiques de la propagation artificielle, d'autre part.

2. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA DUPLICATION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

2.1. Principe de la réplication de l'ADN

La molécule d'ADN (dont la structure a été élucidée en 1953) contient en elle-même son propre principe de réplication : la complémentarité stérique des bases A et T, ainsi que celle des bases G et C, permet de comprendre comment chaque brin est capable de dicter la séquence de son complément et peut servir de matrice pour la synthèse d'un deuxième brin. Les différentes étapes de ce processus sont prévisibles : 1) séparation des deux brins (dénaturation) ; 2) alignement de nucléotides successifs complémentaires sur chacun d'eux ; 3) soudure (ligature) des différents nucléotides pour former une chaîne continue ; 4) séparation des deux molécules filles.

Sur la base de ce principe, différentes modalités de synthèse ont historiquement été envisagées ; elles seront présentées plus loin. En fait, la réponse à ces questions était apportée chez les Bactéries par M. Meselson et F. Stahl dès 1958. Ces auteurs ont mis au point et développé la technique analytique de centrifugation en gradient de chlorure de césium (CsCl) décrite dans le chapitre 3. On rappelle simplement qu'elle permet de séparer des molécules d'ADN possédant en solution des **densités de flottaison** très voisines (1,710 et 1,717 g.cm^{-3}, par exemple). Des légères différences de densité de ce type sont obtenues lorsque l'ADN est enrichi en atomes de l'isotope stable et lourd de l'azote : ^{15}N, au lieu de l'isotope le plus courant : ^{14}N.

L'expérience conduite par Meselson et Stahl est la suivante : une souche de *Escherichia coli* est cultivée pendant de nombreuses générations dans un milieu de culture contenant des sels d'azote (NH_4^+ ou NO_3^-) très enrichis en ^{15}N. Toutes les molécules azotées de ces cellules, et en particulier leur ADN, portent donc en majorité des atomes d'azote ^{15}N. Après purification, cet ADN est mis en solution dans du CsCl concentré (6 M) ; au cours de cette opération, le chromosome bactérien est en général cassé en plusieurs centaines de morceaux. La technique d'ultracentrifugation en gradient de densité montre que cet ADN s'équilibre à

une position correspondant à une densité de 1,724 $g.cm^{-3}$ (ADN lourd), alors qu'un ADN témoin de même origine biologique aurait une densité de 1,710 $g.cm^{-3}$ (ADN léger).

Sur la base de cette possibilité de distinguer aisément différents ADN, les auteurs ont construit le protocole suivant : des Bactéries cultivées pendant de nombreuses générations en présence de ^{15}N, sont rapidement transférées (après lavage) dans un milieu de culture normal, contenant des sels d'azote ^{14}N. La culture est poursuivie pendant un temps tel que trois générations puissent se dérouler (soit environ 90 min, à 37°C). Au cours de cette période de chasse, des échantillons de cellules sont prélevés à des moments successifs, leur ADN est extrait et analysé sur gradient de CsCl. Le résultat des centrifugations est présenté dans la *figure* 12.1. Diverses populations de molécules d'ADN apparaissent au cours du temps, après le transfert :

- 0 min (mise en culture sur le milieu normal) : une seule bande d'ADN lourd.

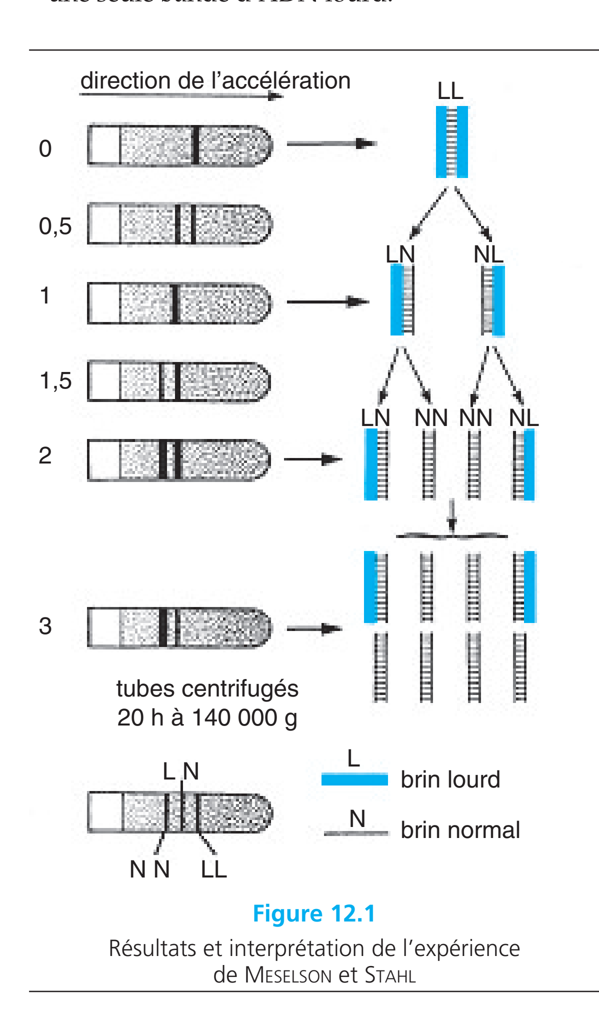


Figure 12.1
Résultats et interprétation de l'expérience de MESELSON et STAHL

- 15 min (génération 0,5) : deux bandes équivalentes en taille : ADN lourd et ADN de densité intermédiaire : d = 1,717.
- 30 min (génération 1) : une seule bande de densité intermédiaire.
- 45 min (génération 1,5) : deux bandes dont l'une correspond à de l'ADN léger et l'autre à de l'ADN de densité intermédiaire ; la première bande est plus petite que la seconde.
- 60 min (génération 2) : même observation, mais les deux bandes sont de taille équivalente.
- 90 min (génération 3) : même observation, mais la bande légère est environ trois fois plus abondante que l'autre. Si l'on poursuit l'expérience, on constate que ce dernier profil à deux bandes n'est plus modifié ; la bande d'ADN de densité intermédiaire tend simplement peu à peu à disparaître au profit de la bande d'ADN léger, qui s'accroît.

La principale conclusion est qu'il n'existe que trois catégories distinctes d'ADN ; il n'y a pas de continuité dans les densités au cours du temps, c'est-à-dire qu'on ne passe pas progressivement d'une espèce d'ADN à une autre (chaque bande apparaît ou disparaît sur place). Ce phénomène est interprété ainsi : l'ADN de densité intermédiaire qui apparaît au début de l'expérience est constitué de deux sous-unités, l'une lourde (ancienne) et l'autre légère (néosynthétisée dans le milieu ^{14}N) ; c'est une molécule «hybride» qui a nécessité, pour être fabriquée, la séparation complète et définitive des deux sous-unités de la molécule lourde initiale. Le même processus se répète à toutes les générations : chaque molécule double-brin est constituée à partir d'une sous-unité ancienne et d'une sous-unité nouvellement synthétisée.

Ce type de réplication est dit **semi-conservatif** car chacun des brins de la molécule-mère d'ADN se retrouve intégralement dans les molécules-filles. Ces expériences ont permis d'éliminer deux autres hypothèses concernant la réplication de l'ADN : le **modèle conservatif** et le **modèle dispersif**. Le premier prévoit que la molécule-mère lourde se retrouve intégralement dans l'une des molécules-filles (l'autre étant complètement néosynthétisée) et qu'elle persiste à chaque génération ; il n'y a donc jamais de molécule de densité intermédiaire dans ce modèle. Le second prévoit que des segments de molécules hybrides existent le long des molécules-filles, c'est-à-dire que les brins de départ peuvent être fragmentés longitudinalement et non pas conservés d'un bout à l'autre, comme dans le

système semi-conservatif ; on devrait donc observer une variation continue de la densité de l'ADN au cours du temps, allant régulièrement de « lourd vers léger ». Dans cette expérience, l'existence des molécules de densité intermédiaire dès la génération 1 permet d'éliminer le modèle conservatif, tandis que l'existence de molécules entièrement légères, apparaissant à la génération 2, et se maintenant par la suite, permet d'éliminer le modèle dispersif.

2.2. Allongement des chaînes polynucléotidiques : polarisation du processus de synthèse

Les travaux de A. Kornberg, dès 1958, ont montré qu'un extrait acellulaire de *E. coli* pouvait provoquer *in vitro* la polymérisation des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP : dNTP) en ADN, à condition que soit fournie au départ une certaine quantité d'ADN agissant comme **matrice**. Les quatre nucléotides étaient absolument indispensables, et l'ADN synthétisé avait une composition moyenne semblable à celle de l'ADN matrice. Ceci suggérait qu'il ne s'agissait pas d'une élongation aléatoire des brins fournis, mais bien d'un vrai recopiage, d'une **réplication**. Les caractéristiques de la protéine responsable de la polymérisation : l'**ADN polymérase**, sont les suivantes :

1) elle nécessite la présence d'une matrice simple-brin qu'elle recopie selon la règle de complémentarité classique ;
2) elle exige la présence d'une **amorce** (d'ADN ou d'ARN) déjà associée à la matrice par des liaisons hydrogène ; cette amorce présente une extrémité 3′ OH libre, et c'est à son niveau que démarre la réplication ;
3) elle a comme substrats exclusifs les quatre dNTP qui apportent l'énergie nécessaire à la réaction de liaison sous la forme de liaisons riches phosphoester ;
4) elle polymérise, à partir de l'amorce, une chaîne de nucléotides dans le sens 5′ → 3′ uniquement, car les nouveaux nucléotides s'accrochent toujours sur le groupement 3′ OH libre du dernier nucléotide mis en place ; le processus est donc orienté.

Le principe du mécanisme de la réplication est résumé dans la *figure* 12.2. Chez les Procaryotes, il existe trois ADN polymérases qui diffèrent par leur masse moléculaire, le nombre des sous-unités

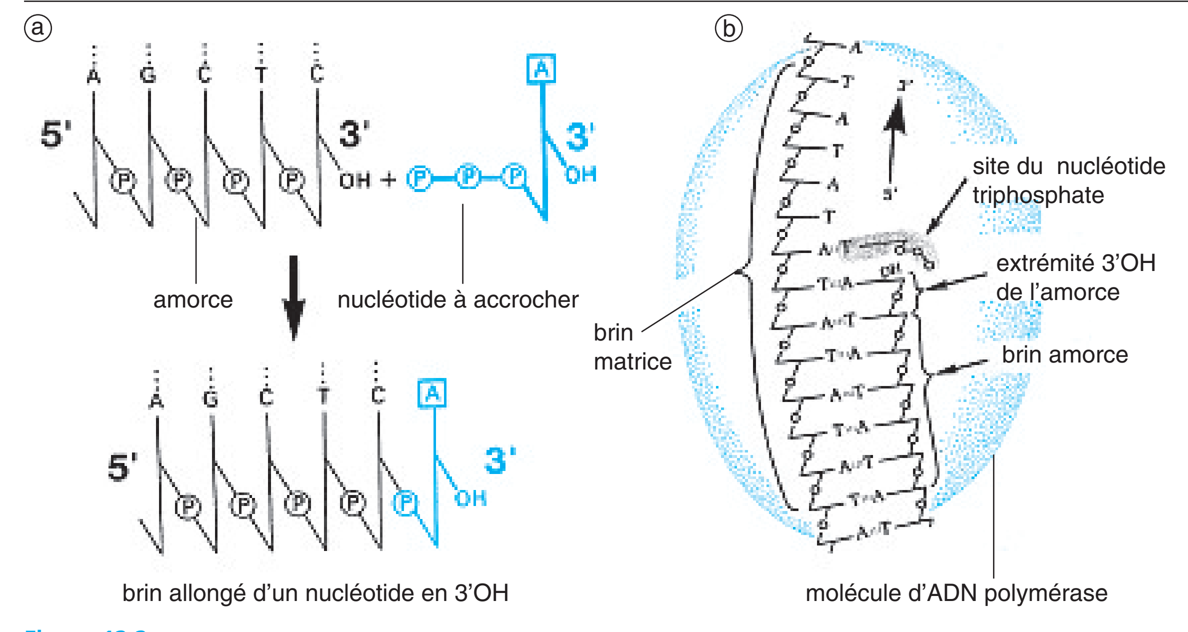


Figure 12.2
Principe de la réplication de l'ADN
(a) Mécanisme de liaison d'un dNTP au niveau de la fonction 3′ OH du dernier nucléotide d'un brin d'ADN ; une molécule de pyrophosphate (P.P) est éliminée. **(b)** Allongement, dans le sens 5′ → 3′, d'un brin d'ADN utilisant un brin matrice complémentaire, catalysé par une molécule d'ADN polymérase.

qui les constituent, leur abondance dans la cellule et l'existence d'activités exonucléasiques associées (sur lesquelles rien ne sera dit ici). Deux d'entre elles sont spécialisées dans la réparation de l'ADN endommagé, tandis que la troisième intervient dans la réplication.

2.3. Fonctionnement des yeux et des fourches de réplication

Toutes les ADN et ARN polymérases connues, procaryotiques ou eucaryotiques, fonctionnent dans un seul sens : 5′ → 3′ ; nous verrons que ceci pose un problème lorsqu'il s'agit de répliquer une molécule d'ADN double-brin, ce qui est le cas général.

2.3.1. Notions d'œil et de fourche de réplication

Le démarrage de la réplication implique la formation d'une petite zone de dénaturation de l'ADN, qui met à nu les deux brins, afin que chacun d'eux puisse servir de matrice ; une amorce adéquate est ensuite installée sur ces deux simple-brins afin d'engager la réplication. Nous verrons plus loin comment ces processus initiaux sont effectivement mis en œuvre au niveau du point de départ, appelé **origine de réplication**. Comme les deux brins de l'ADN sont antiparallèles, les deux amorces sont dirigées en sens opposé ; les deux molécules d'ADN polymérase se déplacent donc dans des directions opposées, chacune sur son brin matrice : la progression est bidirectionnelle. La zone de dénaturation initiale est ainsi agrandie et prend la forme d'un œil (**œil de réplication**), dans lequel les processus progressent de façon symétrique par rapport à l'origine (voir *figure* 12.3).

Cette description soulève un problème lié au caractère incomplet de la réplication, puisque la structure obtenue reste simple-brin sur une moitié de chaque demi-œil (du côté de 5′ de chaque amorce). Comme l'œil de réplication correspond à une réalité biologique, visible au microscope chez les Procaryotes comme chez les Eucaryotes (voir plus loin), il a fallu trouver une explication à cette anomalie. Le terme de **fourche de réplication**, qui sera souvent utilisé à partir de maintenant, doit être défini ici : une fourche correspond à chacune des deux parties de l'œil qui a une forme de Y. Les deux fourches, au niveau desquelles se déroulent les événements clés de la réplication, ont un fonctionnement identique et progressent de façon opposée, à la même vitesse.

2.3.2. Synthèses du brin continu et du brin discontinu

L'explication du phénomène a été apportée, chez les Bactéries, grâce à des expériences de marquage radioactif bref de l'ADN *in vivo* (*pulses*). On montre que l'ADN de ces cellules contient de courts fragments d'ADN simple-brin (1 000-2 000 nucléotides) liés à la molécule-mère par des liaisons hydrogène, à proximité des fourches de réplication. Ces fragments (dits **fragments d'Okasaki**, du nom de leur découvreur), participent à la réplication de la deuxième branche de la fourche de la manière décrite dans la *figure* 12.3 ; des fragments équivalents ont aussi été mis en évidence chez les Eucaryotes, mais leur longueur est environ dix fois plus courte. Les deux brins d'ADN ont donc un mode de fabrication complètement différent ; celui à synthèse continue est dit **brin précoce** (ou brin avancé), celui à synthèse discontinue, résultant de la soudure des fragments d'Okasaki, est dit **brin tardif** (ou brin retardé).

2.3.3. Enzymologie de la fourche de réplication

Après avoir examiné la réplication sous un angle mécanique, il faut maintenant l'analyser dans ses aspects enzymologiques. L'ouverture de la molécule double-brin au niveau de l'origine de réplication met en jeu des **protéines d'initiation** spécifiques, qui reconnaissent des séquences d'ADN caractéristiques de cet endroit des chromosomes, et se fixent sur elles. Ces protéines et ces séquences sont bien identifiées chez les Bactéries, mais elles restent mal connues chez les Eucaryotes. Une deuxième catégorie de protéines, capables de séparer les deux brins de l'ADN, intervient ensuite : elles sont appelées **hélicases**. Le processus de dénaturation exige de l'énergie, et celles-ci nécessitent de l'ATP pour fonctionner : ces ATPases/ADN dépendantes sont parfois appelées « facteurs de détorsion » (voir *figure* 12.4).

Lorsque l'œil initial est suffisamment ouvert, une amorce est installée sur chaque brin ; cette opération ne peut être réalisée par des ADN polymérases, car ces enzymes ne savent pas démarrer une

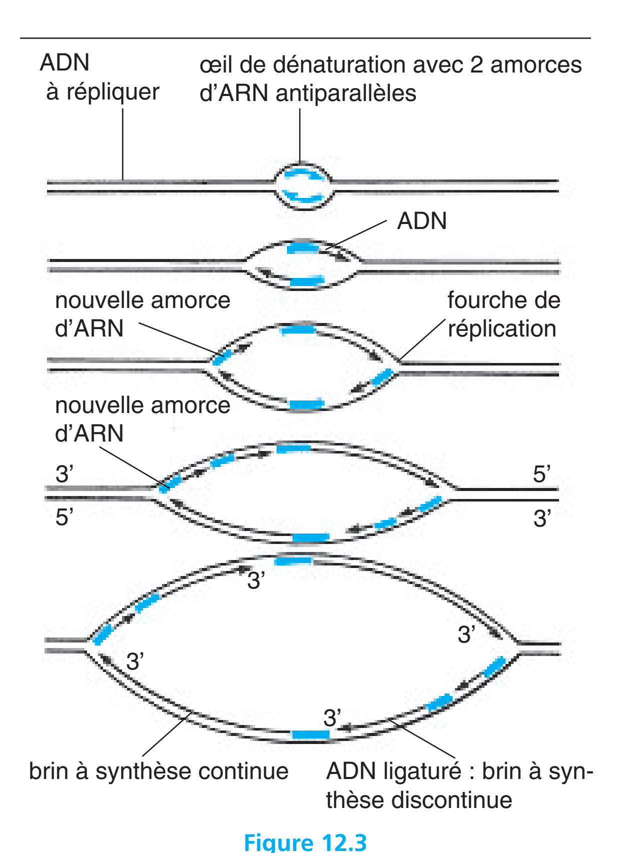


Figure 12.3

Fonctionnement simplifié d'un œil de réplication

À mesure que celui-ci s'ouvre, sous la « poussée » du brin d'ADN synthétisé de façon continue (brin précoce), de nouvelles amorces d'ARN s'installent sur le simple-brin opposé qui est dégagé ; elles permettent une polymérisation normale (5′ → 3′) pour le nouveau brin, mais qui se fait à contre-courant du sens de l'ouverture de la fourche. La synthèse de ce brin est donc discontinue, puisqu'elle se réalise par morceaux fabriqués successivement et mis bout à bout ; ces segments sont ensuite ligaturés les uns aux autres pour former un brin physiquement continu (brin tardif).

synthèse de brin complémentaire. Ces amorces sont toujours constituées d'ARN car seules les ARN polymérases peuvent fabriquer directement un ARN sur de l'ADN ; les enzymes spécifiques qui fonctionnent au niveau des yeux de réplication sont appelées **ARN primases** (*primer* = amorce) et elles synthétisent de courts fragments d'ARN (15-30 nucléotides environ). Lorsque ces amorces sont en position, les primases laissent la place à des ADN polymérases (dites ADN Pol III) qui trouvent ainsi des groupements 3′OH qu'elles utilisent pour prolonger le brin. Les deux brins précoces du schéma décrit plus haut sont ainsi synthétisés de façon continue à mesure que les hélicases progressent.

La synthèse du second brin pose un problème lié au fonctionnement des polymérases dans le sens 5′ → 3′. Lorsqu'un segment assez long d'ADN simple-brin est dégagé au niveau de la fourche, une ARN primase s'installe à ce niveau et y fabrique une amorce dont le 3′OH est évidemment tourné dans le sens opposé à la progression de la fourche. L'ADN polymérase III utilise ensuite cette amorce et allonge un nouveau brin d'ADN, en fonctionnant à contre-courant de l'ensemble du système, mais la longueur de ce brin est limitée par la place disponible en avant de l'enzyme. La synthèse est donc discontinue et se déroule ainsi : la fourche ayant continué de progresser dans l'intervalle de temps, un nouveau segment d'ADN simple-brin est dégagé au niveau de la fourche et la primase peut fabriquer une nouvelle amorce qui sera exploitée par l'ADN polymérase ; et ainsi de suite. Cette dernière enzyme va, à un moment donné, buter sur l'amorce d'ARN faite précédemment ; c'est alors qu'intervient une activité enzymatique de type **ARNase**, qui digère progressivement l'ARN, afin qu'il puisse être remplacé par de l'ADN (activités assurées par l'ADN Pol I). On obtient ainsi

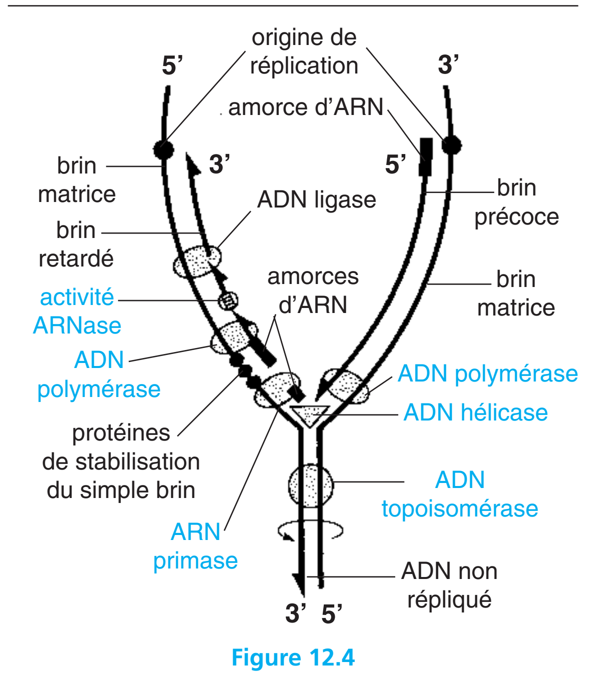


Figure 12.4

Principales activités enzymatiques impliquées dans le fonctionnement d'une fourche de réplication

La progression de la synthèse des nouveaux brins est très différente selon que l'on considère le brin précoce ou bien le brin tardif. Ce principe général de réplication de l'ADN, qui utilise près d'une dizaine de protéines, est valable aussi bien chez les Procaryotes que chez les Eucaryotes.

une succession de segments d'ADN, juxtaposés mais non soudés, représentant le deuxième brin néosynthétisé : ce sont les fragments d'Okasaki, qui sont enfin reliés par des liaisons phosphoester grâce à une **ligase**, enzyme consommant de l'ATP pour réaliser cette opération.

Toutes les enzymes impliquées dans la polymérisation constituent un très gros édifice fonctionnant au cœur de la fourche, incluant deux molécules d'ADN polymérase (une pour chaque brin) ainsi qu'un complexe associant l'hélicase et la primase. D'autres protéines sont mises en jeu au niveau de la fourche : il s'agit des **protéines de stabilisation du simple brin**, qui se fixent sur le brin matrice utilisé à contre-courant ; leur rôle est d'empêcher que celui-ci ne se renature sur lui-même si des séquences auto-complémentaires existent à proximité l'une de l'autre. La progression des polymérases serait entravée par l'existence d'« épingles à cheveux double-brin » se mettant spontanément en place sans l'intervention de ces protéines spécifiques.

Il faut enfin évoquer un dernier problème posé au niveau des fourches : le **surenroulement** ; à mesure que l'œil s'agrandit, lors de la réplication, l'ADN non répliqué qui se trouve de part et d'autre est soumis à une tension mécanique (torsion) de plus en plus grande. Pour visualiser ceci, il suffit d'ouvrir les brins d'une ficelle double et de les écarter progressivement : on constate que les deux extrémités libres se mettent à tourner ; en revanche, si elles ne sont pas libres, l'écartement de l'œil conduit à l'apparition de vrilles et, pour cette raison, il existe une limite à la taille de l'œil qui peut être ouvert. Or, ce problème se pose au sein des chromosomes, soit parce qu'ils sont fermés sur eux-mêmes (cas des ADN bactériens), soit parce que les longues molécules linéaires sont fixées au niveau de structures les empêchant de tourner librement, et forment des boucles (cas des Eucaryotes). Les cellules disposent en fait d'un système qui permet à l'ADN de tourner librement en avant des fourches : des enzymes spécifiques coupent la molécule, soit sur un brin, soit sur les deux, et la referment. Dans l'intervalle, l'ADN a pu tourner et libérer la tension mécanique, à la manière de ce qui se passe au niveau d'un émerillon placé le long d'une chaîne ; on appelle **topoisomérases** ces enzymes qui changent simplement la topologie des molécules d'ADN.

La réplication, qui implique un nombre important de protéines distinctes, est donc un phénomène d'une extrême complexité. Cependant, grâce à divers mécanismes de vérification et de correction du message recopié, ce processus présente une fidélité remarquable, puisqu'une seule erreur sur 10^9 paires de bases est commise. Ce sont ces mutations qui, lorsqu'elles sont tolérées par les organismes, sont responsables du fait que la vie n'est pas indéfiniment restée figée dans un même schéma depuis son apparition sur la terre (voir chapitre 1). Il existe enfin des mécanismes permettant la réparation de l'ADN accidentellement endommagé par des agents chimiques ou physiques, qui utilisent des processus communs à ceux mis en jeu dans la réplication (voir plus loin).

2.4. Duplication du chromosome bactérien

2.4.1. Mise en évidence cytologique du phénomène

Les premières expériences relatives à cette question datent de 1963 (J. Cairns) ; elles font date dans l'histoire de la biologie moléculaire car elles ont fourni les premières images du chromosome bactérien complet en train de se dupliquer. Elles sont basées sur l'utilisation de précurseurs radioactifs de l'ADN, afin de le visualiser par autoradiographie (voir chapitre 3), et sur la mise au point de techniques très douces d'isolement du chromosome bactérien (voir l'encart suivant).

Encart historique

La visualisation de la réplication de l'ADN bactérien

Des cellules de *E. coli* sont mises en culture dans un milieu contenant de la thymidine ^3H, qui s'incorpore exclusivement dans l'ADN. Après des temps d'incubation variables, les cellules sont lysées en présence de détergent et soumises à un choc osmotique : elles éclatent donc en répandant leur contenu, y compris leur chromosome, qui se déroule plus ou moins. Les opérations se déroulent directement sur une lame de verre qui sert de support aux molécules d'ADN. Dans la mesure où les Bactéries ne sont pas manipulées et agitées, on peut imaginer que leur chromosome reste intact ; la solution de lyse contient en outre des protéines basiques qui se fixent sur lui et le consolident. L'autoradiographie appliquée à ces préparations permet

de visualiser uniquement (sous la forme d'une succession de grains d'argent) les molécules d'ADN radioactives collées sur la lame, ou leurs seuls segments radioactifs, si elles ne sont pas marquées sur toute leur longueur.

Les résultats sont les suivants : lorsque le temps de marquage est court par rapport au temps de génération (30 min), les figures autoradiographiques observées au microscope photonique ont soit la forme de V majuscules, soit la forme d'yeux semblables à ceux décrits de façon théorique plus haut (voir *figure* 12.5). Pour des incubations dans le traceur de 5 min, la longueur d'ADN marqué est de 100 µm environ pour chaque branche du V. À mesure que le temps d'incubation s'allonge, on constate que les branches des V ou la taille des yeux augmentent de longueur. Dans tous les cas, l'épaisseur des traits pointillés visibles au microscope reste constante, ce qui témoigne d'une radioactivité égale tout le long de l'ADN. Lorsque l'incubation dépasse la durée d'un cycle de division, des cercles complets de 1,2 mm de circonférence sont observés, présentant un seul œil dans lequel une des deux branches est nettement plus épaisse que l'autre ; cette différence d'épaisseur traduit l'existence d'une radioactivité plus intense au niveau de l'ADN. Ce type d'image démontre qu'il existe une seule origine de réplication par chromosome bactérien, à partir de laquelle se met en place un œil unique qui, en s'agrandissant progressivement, fait le tour complet de la molécule.

Le processus de réplication semi-conservative explique le fait que, lorsque l'ADN est extrait de cellules ayant fait plus d'un cycle de division dans le traceur, on observe un cercle complet légèrement marqué, tandis qu'une des branches de l'œil (qui s'est mis en route dans le milieu radioactif) est quant à elle plus fortement marquée. À cet endroit précis, l'ADN est en effet marqué sur ses deux brins : un qui l'avait été au cours du cycle de réplication précédent, et l'autre qui était en train de se marquer pendant sa synthèse au moment où il a été extrait. L'autre branche de l'œil présente un marquage semblable à celui du reste de la molécule car, à son niveau, un seul des deux brins est radioactif. Ce résultat spectaculaire ne démontre pas que le fonctionnement de l'œil de réplication est bidirectionnel, et d'ailleurs l'auteur de ces expériences avait conclu à un fonctionnement unidirectionnel : un point de démarrage fixe et une seule fourche. Des expériences ultérieures ont permis de corriger cette erreur et de confirmer des données génétiques qui suggéraient alors un phénomène de bidirectionnalité de la réplication.

2.4.2. Mécanismes de la réplication du chromosome bactérien

Des expériences plus récentes (1973) démontrent que les points de démarrage et de terminaison sont en fait situés de façon diamétralement opposée dans le chromosome, ce qui est attendu si les deux fourches progressent en direction opposée et à la même vitesse. La *figure* 12.6 présente un

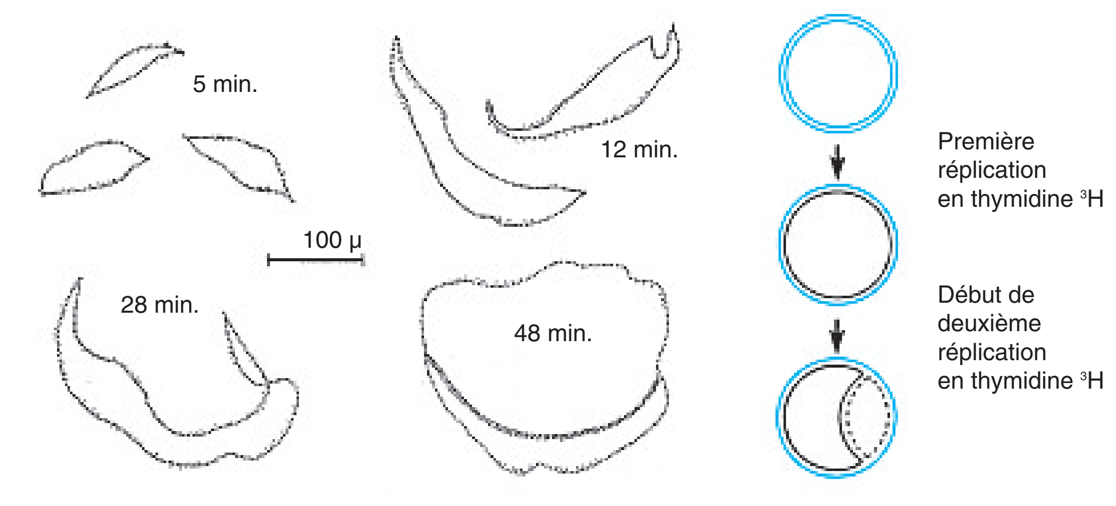


Figure 12.5
Résultats et interprétation de l'expérience de Cairns

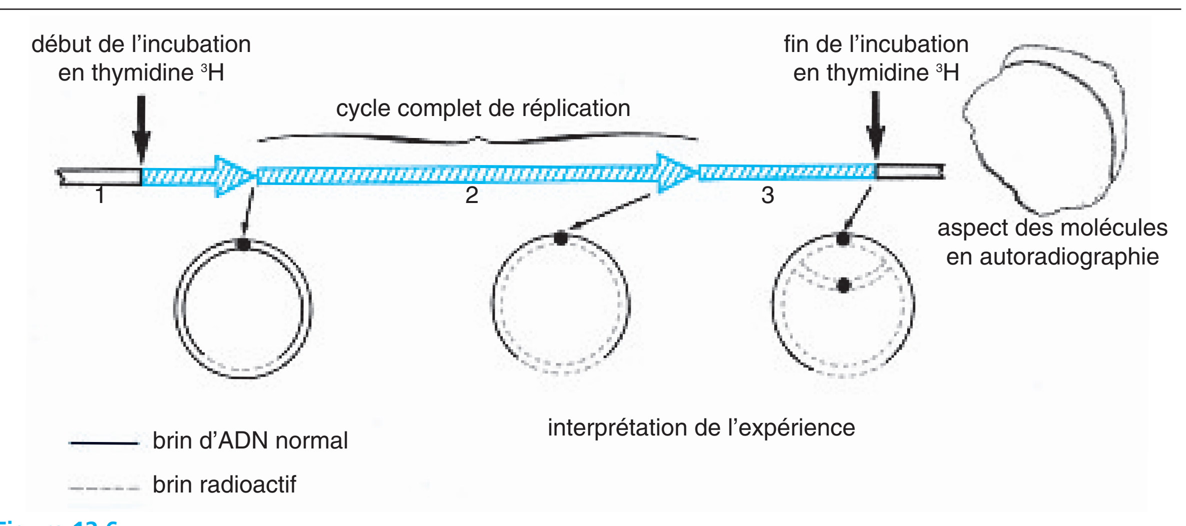


Figure 12.6

Mécanisme de réplication du chromosome bactérien

Dans une population de cellules synchrones, on réalise un marquage radioactif démarrant à la fin du cycle n° 1, de sorte que la radioactivité s'incorpore dans l'ADN au niveau de la région du point de terminaison de la réplication. Une fois ce cycle terminé, les cellules sont encore cultivées en présence de radioactivité pendant un peu plus d'un cycle de division (cycles n° 2 et 3), puis elles sont traitées pour l'autoradiographie.

protocole construit pour démontrer ce fait ; celui-ci est basé sur l'utilisation d'une **culture synchrone** de Bactéries, c'est-à-dire de cellules qui (grâce à un artifice qui ne sera pas présenté ici) sont toutes, à un même moment, au même stade de leur cycle de division. Ce protocole prévoit que :

– toutes les molécules sont marquées sur la totalité de leur longueur (au cours du cycle complet n° 2) au moins sur un des deux brins de l'ADN, de sorte qu'elles sont complètement visibles par autoradiographie ;
– une molécule sur deux a sa région de terminaison doublement marquée car l'un des deux brins a été marqué à ce niveau au cours de la fin du cycle n° 1 et l'autre l'aura été à la fin du cycle n° 2 ;
– les yeux de réplication qui s'engagent au début du cycle n° 3 seront eux aussi marqués sur leurs deux branches, l'une des deux l'étant cependant deux fois plus que l'autre, pour des raisons semblables à celles expliquées plus haut.

Le résultat de cette expérience est le suivant : pour toutes les molécules dans lesquelles la région de terminaison est repérable, l'œil nouvellement ouvert se trouve exactement à l'opposé de celle-ci dans la molécule circulaire. On doit donc conclure que chez *E. Coli* – et ceci est vrai pour toutes les Bactéries –, il n'existe par chromosome qu'un seul point de démarrage de la réplication, et que celle-ci se réalise de manière bidirectionnelle.

Ces expériences d'incorporation permettent en outre de comparer les vitesses des phénomènes observés *in vivo* à celles obtenues grâce à des systèmes reconstitués *in vitro*. On mesure de cette façon que la vitesse de progression de la fourche chez les Procaryotes est d'environ 500 nucléotides par seconde. Sachant que le génome de *E. Coli* comprend $4{,}6.10^6$ nucléotides (voir chapitre 4) et qu'un cycle dure environ 25 min, on calcule que la cellule ne peut pas répliquer plus de $1{,}5.10^6$ nucléotides pendant cette période, soit moins de la moitié du chromosome. Comment régler cette contradiction apparente ? En fait, lorsque les cellules se divisent en moins de 75 min (temps minimum pour que les données concordent, d'après le calcul précédent), les chromosomes entament un deuxième cycle de division avant même que le premier soit terminé. On a donc deux yeux emboîtés l'un dans l'autre, de sorte que la cellule réplique « en moyenne » la totalité de son génome dans le temps imparti ; lorsqu'une cellule-fille hérite d'un chromosome, il est déjà en fait partiellement répliqué.

2.4.3. Séparation des molécules-filles et division de la cellule bactérienne

Il est admis que les gros complexes enzymatiques intervenant dans la réplication sont associés à la membrane plasmique des cellules bactériennes ; l'ADN reste donc toujours accroché à elle

et c'est lui qui, en fait, se déplace par rapport à ces complexes lors de sa synthèse (contrairement à ce qui a été décrit, pour des raisons de simplification). À la fin de la réplication, les deux chromosomes-frères, localisés dans la région médiane de la cellule, se séparent puis s'éloignent l'un de l'autre à la faveur d'une synthèse de membrane et de paroi à ce niveau (voir plus loin). C'est la simple extension de cette zone interchromosomique qui constitue le mécanisme de partage de l'information génétique entre les cellules-filles. Du point de vue cellulaire, la division bactérienne est étroitement couplée à la duplication du chromosome ; la croissance qui se produit au cours de la vie de la cellule conduit à un doublement de sa taille, ce qui se traduit en général par un allongement. La partition du cytoplasme en deux moitiés égales s'effectue grâce à une cloison médiane (**septum**) qui se forme au niveau d'un repli membranaire localisé entre les «pieds» des deux chromosomes-frères venant de se diviser. Cette cloison fonctionne comme un diaphragme qui se ferme progressivement, donnant ainsi naissance à deux cellules-filles identiques possédant chacune sa propre membrane et sa propre paroi ; la *figure* 2.12 montre des Bactéries en cours de division.

2.5. Duplication des chromosomes eucaryotiques

Les mécanismes fondamentaux de la réplication (réplication semi-conservative, fonctionnement des fourches) sont identiques chez les Procaryotes et les Eucaryotes, mais on observe cependant une plus grande complexité chez les derniers. Les principales différences tiennent au fait que, chez les Eucaryotes : 1) les molécules à répliquer sont linéaires et beaucoup plus longues : 50 à 100 fois ; 2) l'ADN est empaqueté dans la chromatine sous forme de nucléosomes ; 3) il existe plusieurs molécules d'ADN à répliquer au même moment. L'étude de la réplication chez ces organismes a bénéficié des techniques développées initialement chez les Procaryotes, ainsi que des perfectionnements des méthodes de visualisation directe de l'ADN en microscopie électronique (voir la technique d'ombrage métallique ; chapitre 3).

2.5.1. Analyse autoradiographique de la réplication

Le protocole présenté ici diffère légèrement de celui décrit chez les Bactéries : on réalise en effet deux marquages successifs *in vivo*, de même durée, en employant deux solutions radioactives d'activités spécifiques bien différentes, de sorte que le signal observé sur les préparations autoradiographiques sera d'autant plus fort que la radioactivité est intense au niveau de l'ADN. Dans un premier temps, on fournit ainsi aux cellules en culture un précurseur faiblement radioactif qui induira un marquage peu intense de l'ADN, puis dans une deuxième étape on ajoute au milieu de culture une quantité supplémentaire de thymidine fortement radioactive, qui marquera davantage l'ADN. Cet artifice permet donc de repérer le temps dans une expérience autoradiographique. Comme on s'adresse en général à des cellules non synchrones et dans lesquelles les différentes origines de réplication ne démarrent pas en même temps, les images obtenues sur les préparations autoradiographiques sont beaucoup plus diverses que celles vues chez les Bactéries.

On observe soit des yeux entièrement marqués, soit des yeux incomplets, mais qui montrent toujours un marquage symétrique (voir *figure* 12.7). Dans les yeux entiers les plus longs, qui se sont donc ouverts dès le début de l'incubation dans le

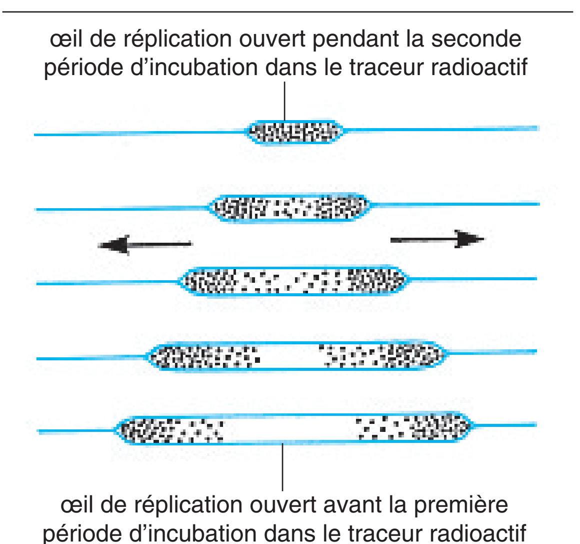


Figure 12.7
Fonctionnement bidirectionnel des yeux de réplication eucaryotiques

Schémas illustrant la diversité des figures obtenues après une expérience de marquage en deux temps, suivie d'une autoradiographie ; la seconde période correspond à un précurseur dont l'activité spécifique est supérieure à celui de la première période. Seuls les grains d'argent (en noir) sont vus sur les documents autoradiographiques.

premier traceur, les deux branches à proximité immédiate des fourches sont beaucoup plus marquées que les parties centrales (celles qui encadrent l'origine de réplication) ; les traits fins et épais d'un demi-œil ont la même longueur. Ceci est cohérent avec le fait que les deux fourches ont progressé de façon bidirectionnelle au cours des deux périodes d'incubation, la dernière d'entre elles étant responsable du marquage le plus intense. D'autres figures sont en outre observées, en fonction du moment où les yeux ont démarré par rapport à la double période de marquage *in vivo* :

1) des yeux complets, plus courts que les précédents, différents les uns des autres par la longueur des traits fins ou épais, témoignant ainsi des différences de durée de fonctionnement dans les deux bains successifs ;
2) des yeux incomplets avec une zone centrale non vue (non marquée), de longueur variable ; la longueur des traits fins et des traits épais est la même au niveau des branches des fourches. Ces images correspondent à des yeux qui se sont mis en route avant le début de l'expérience, à des moments divers, et qui ont fonctionné pendant toute la durée de l'incubation.

Chez les Eucaryotes, la vitesse de progression des fourches est d'environ 1 µm par minute, ce qui représente une vitesse de polymérisation de l'ordre de 50 nucléotides par seconde. Le phénomène est donc 10 fois plus lent que chez les Procaryotes, ceci tenant au fait que l'ADN bactérien n'est pas empaqueté dans des nucléosomes (bien qu'il ne soit pas complètement nu) et qu'il est ainsi plus facile à répliquer.

2.5.2. Mise en évidence d'origines de réplication multiples

L'étalement et l'observation directe en microscopie électronique de chromatine ou de molécules d'ADN purifié à partir de cellules en division rapide montrent que les chromosomes eucaryotiques sont formés d'un grand nombre d'unités de réplication, ayant chacune une origine de réplication propre (**réplicons**), et se présentant sous la forme de nombreux yeux contigus. Comme la taille des yeux voisins est très variable (et on peut difficilement imaginer des vitesses de progression des fourches très différentes), on doit conclure que chaque origine se met en route à un moment différent de celui des origines voisines (voir *figure* 12.8).

Le simple calcul suivant prouve la nécessité d'un nombre élevé d'origines de réplication par chromosome. La phase de synthèse de l'ADN au cours du cycle cellulaire des cellules humaines en culture dure environ 8 heures ; on admet qu'un chromosome moyen est constitué d'une molécule d'ADN de 4 cm de long (voir plus loin). À raison de 2 µm d'ADN synthétisés par œil et par minute,

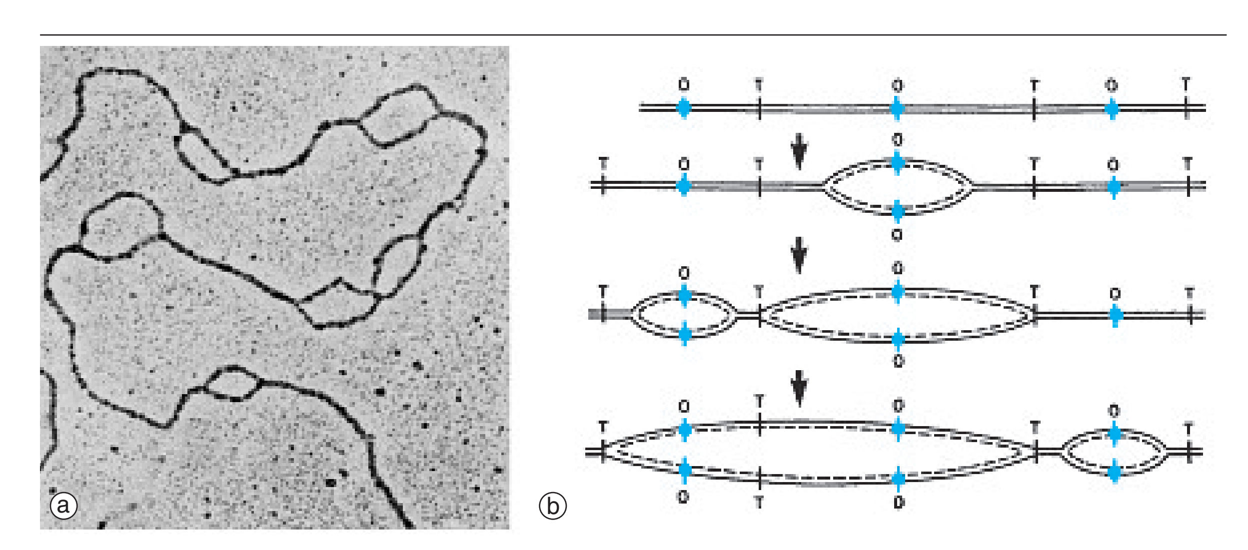


Figure 12.8

Yeux de réplication multiples des chromosomes eucaryotiques

(a) Photographie, en microscopie électronique, d'ADN d'embryon d'Amphibien après étalement et ombrage métallique. **(b)** Schémas montrant l'ouverture successive de plusieurs réplicons le long d'un chromosome (O : origine de réplication ; T : point de terminaison). Cliché Labo. BG., Orsay.

on obtient la valeur de 333 h pour un tel chromosome, dont l'origine serait située exactement au milieu. Le nombre théorique d'origines de réplication le long de ce dernier est donc de 42 (333/8). Il s'agit d'une valeur minimale, car on a postulé que : 1) toutes les branches progressent à la même vitesse, 2) toutes les origines sont équidistantes, et 3) elles se mettent en route en même temps, ce qui est infirmé par la cytologie. Chez l'Homme, on considère qu'il existe une centaine d'unités de réplication par chromosome moyen, séparées par des distances de 3 à 30.10^4 nucléotides.

Les origines de réplication ont été identifiées de façon certaine au niveau moléculaire uniquement chez la levure de bière ; on en compte environ 400 dans le génome complet et elles sont constituées d'une dizaine de séquences répétées de 11 nucléotides, riches en A et T. Ce sont les **séquences** dites **ARS**, pour «séquences de réplication autonomes». Lorsque de telles séquences sont introduites par génie génétique dans les plasmides quelconques (voir chapitre 14), elles permettent leur réplication dans la cellule au même rythme que les séquences nucléaires normales ; elles sont sans doute reconnues par des protéines d'initiation de la réplication dont le principe de fonctionnement est semblable à celui proposé plus haut pour les Bactéries.

2.5.3. Autres particularités propres aux Eucaryotes

La taille et l'organisation des génomes des Eucaryotes conduisent à d'autres caractéristiques spécifiques de la réplication de leurs chromosomes.

Tout d'abord, la mise en route des origines de réplication fait l'objet d'un contrôle strict, car celles-ci ne doivent fonctionner qu'une seule fois par cycle et doivent s'ouvrir selon un ordre chronologique précis. La microscopie électronique suggère que les réplicons proches les uns des autres démarrent en phase et sont séquentiellement activés par paquets de quelques dizaines. On sait peu de choses actuellement sur la coordination de ces processus, sinon que la synthèse protéique est nécessaire pour que le démarrage et la réplication continue des groupes d'unités de réplication signalés plus haut aient lieu. Il semble par ailleurs que les régions de l'ADN riches en paires G-C soient répliquées avant celles riches en paires A-T ; ceci tient sans doute au fait que la chromatine est plus ou moins condensée en interphase en fonction de sa composition en bases (nous verrons plus loin que les régions télomériques et centromériques des chromosomes sont respectivement plus riches en bases G-C et A-T que le reste de l'ADN). L'hétérochromatine, qui est très condensée en interphase et inactive en transcription, est répliquée de façon tardive au cours de la période de synthèse de l'ADN (phase S ; voir plus loin) ; il pourrait s'agir tout simplement d'un problème d'accessibilité moins grande de l'ADN aux enzymes de réplication.

Il existe deux régions des chromosomes eucaryotiques qui posent un problème que l'on ne rencontre pas lors de la réplication des chromosomes circulaires bactériens : il s'agit des extrémités, ou **télomères**. Dans la mesure où le brin d'ADN à synthèse discontinue est toujours amorcé par un ARN situé en amont du mouvement général de la réplication, sa longueur sera toujours plus courte (de quelques bases) que celle de son brin matrice, au niveau de l'extrémité du chromosome. Comme ceci se reproduit à chaque cycle cellulaire, on comprend que la structure du télomère sera rapidement altérée chez les cellules en prolifération. On a en fait démontré l'existence d'une enzyme (la **télomérase**) capable d'ajouter, à chaque cycle de division, les bases manquantes au brin discontinu sous la forme de séquences non spécifiques et non codantes. Le fonctionnement complexe de cette enzyme ne peut pas être développé ici.

La dernière particularité de la réplication des chromosomes eucaryotiques tient au fait que l'ADN y est empaqueté au sein des **nucléosomes** (voir chapitre 8). Deux questions se posent : 1) que deviennent les nucléosomes portés par la molécule d'ADN initiale ? et 2) comment sont fabriqués (en quantité égale) et assemblés les nouveaux nucléosomes mis en place sur l'ADN néosynthétisé ? Il est admis que les nucléosomes ne se détruisent pas et ne se dissocient jamais complètement de l'ADN : tout au plus, se séparent-ils en leurs deux moitiés qui restent accrochées au même brin d'ADN lors de la réplication. Comme le montre la microscopie électronique, quelques minutes suffisent pour que les nouveaux nucléosomes soient mis en place sur les deux branches des fourches de réplication de l'ADN ; la répartition des nouveaux et des anciens nucléosomes par rapport à ces branches fait encore l'objet de recherches.

Il existe cinq types d'ADN polymérases chez les Mammifères, que l'on peut distinguer par divers critères enzymologiques ; l'une d'elles (dite γ) est

spécifique des mitochondries et n'entre pas dans la constitution des complexes nucléaires dont on a parlé plus haut. Les quatre autres activités sont impliquées dans l'allongement normal des chaînes d'ADN au niveau des fourches et dans la réparation de l'ADN accidentellement lésé. L'ADN Pol δ est l'enzyme principale mise en œuvre dans l'allongement des brins direct et retardé ; l'ADN Pol α est impliquée dans la synthèse des brins d'Okasaki.

3. MÉCANISMES DE RÉPARATION DE L'ADN

De manière à minimiser au maximum les effets néfastes des modifications de l'ADN, les cellules ont développé des mécanismes très efficaces de réparation. Leur importance est attestée par le nombre élevé de gènes impliqués dans ces processus, identifiés dans les génomes (environ 5 %).

3.1. Modifications spontanées ou provoquées de l'ADN

3.1.1. Modifications spontanées

Il s'agit essentiellement des processus de désamination des bases (par exemple, C donne U ; A donne de l'hypoxanthine), ou de dépurination (les bases puriques se détachent du désoxyribose, et forment des sites apuriniques). Ce dernier processus est favorisé par la simple chaleur des organismes à sang chaud, et on considère que chacune de nos cellules perd, chaque jour, plus de 5 000 bases puriques, qu'elle devra impérativement remplacer, sous peine de dommages graves !

3.1.2. Modifications provoquées par des agents génotoxiques

Les radiations ultraviolettes (UV) et les radiations ionisantes (émises par les composés radioactifs) font partie des nombreux agents physiques susceptibles d'altérer l'ADN, pouvant même le casser sur ses deux brins. Certains composés chimiques d'origine interne (oxygène actif) ou externes, produits par l'environnement (substances cancérigènes : nitrosamines, benzopyrènes, contenus dans les goudrons des cigarettes, par exemple) sont connus pour altérer les bases de l'ADN. L'addition de divers groupements chimiques (méthyle, éthyle) aux bases de l'ADN peut aussi être la conséquence, chez l'Homme, de la manipulation sans précautions de produits industriels variés. Les UV sont une source majeure d'altération, et leur action est bien connue : deux bases pyrimidiques successives dans un brin d'ADN (T ou C) se lient l'une à l'autre de façon covalente et se dissocient de leurs bases complémentaires ; s'il s'agit de deux T, on parle de « dimères de thymine ». La distorsion locale de la molécule qui en découle est détectée par les systèmes de correction, qui sont multiples, pour cette anomalie.

3.2. Nécessité de systèmes de réparation

De nombreux complexes enzymatiques surveillent sans cesse la molécule d'ADN, en la parcourant et y en détectant des anomalies, qui se présentent en général sous la forme de protubérances. Une grande diversité de systèmes, parfois redondants, est alors mise en œuvre pour réparer l'ADN endommagé. On considère que moins d'une modification sur mille n'est pas corrigée. Toutes les altérations de l'ADN ont un caractère mutagène. La désamination de C en U, par exemple, si elle n'est pas corrigée, est à l'origine d'une mutation car, lors de la réplication d'une des deux molécules filles obtenues à partir de celle qui a été altérée, la paire de bases initiale CG sera transformée en AT. De la même façon, une guanine qui est méthylée s'apparie avec T au lieu de C. Les conséquences de ces modifications peuvent être désastreuses pour l'organisme, au sein des cellules somatiques, à travers l'apparition de **cancers**, par exemple.

Si la survie à court terme des cellules et des organismes dépend de leur capacité à corriger les changements apparus dans l'ADN, la continuité des espèces dans la durée implique une certaine possibilité de variation de leur matériel génétique. La très faible fréquence de mutations persistant après intervention des systèmes de correction, est à l'origine d'une réserve de variabilité dans les populations, sur laquelle la sélection naturelle pourra s'exercer, en réponse aux variations des conditions du milieu. L'évolution des espèces est basée sur cette imperfection, dont chaque individu peut avoir à subir les conséquences immédiates. Un équilibre est donc établi entre une correction parfaite et la nécessité d'évolution.

3.3. Différents mécanismes de réparation

3.3.1. Réparation immédiate par « réversion directe » de l'anomalie

On connaît depuis longtemps une enzyme bactérienne capable de défaire les ponts établis entre deux T, sous l'action des UV, en utilisant la lumière visible comme source d'énergie (photoréparation). Ce mécanisme, très répandu dans le monde vivant, n'existe pas chez l'Homme, où il est remplacé par un processus plus complexe (voir plus loin). D'autres enzymes décrochent certains groupements chimiques accidentellement ajoutés aux bases et restaurent leur forme normale (ex. : les déméthylases). Peu d'altérations sont en fait concernées par ces mécanismes.

3.3.2. Réparation par excision de bases ou d'oligonucléotides

La plupart des systèmes de réparation procèdent par élimination du nucléotide erroné, seul, ou inclus dans un oligonucléotide qui est excisé puis resynthétisé à partir du brin matrice intact. Ces processus impliquent des enzymes spécifiques (endonucléases), mais aussi des enzymes intervenant normalement dans la réplication : hélicase, ADN polymérase et ligase. Chez l'Homme, l'uracile, l'hypoxanthine et les très nombreux sites apuriniques spontanés sont corrigés par ce système, qui élimine aussi les dimères de T. Toute inactivation de l'une ou l'autre des enzymes en jeu empêche la réparation de l'ADN et conduit à une maladie génétique se traduisant par une fréquence d'apparition des **cancers de la peau** 2 000 fois supérieure à la normale.

3.3.3. Réparation des paires de bases mésappariées

Certaines erreurs de réplication, qui persistent malgré l'activité autocorrective de l'ADN polymérase, consistent en des paires de bases mal appariées (A et G, par exemple). Un système de réparation spécifique repère les endroits concernés et procède à une excision de part et d'autre de l'anomalie, puis à une resynthèse de l'oligonucléotide qui a été éliminé, comme on l'a vu précédemment. Le problème évident, dont la solution ne sera pas donnée ici, est de distinguer le brin erroné du brin correct ! Une prédisposition au **cancer du côlon**, chez l'Homme, est liée à une mutation dans un des gènes mis en œuvre dans ce système (voir Perspective Biomédicale).

3.3.4. Réparation des cassures « double-brin » de l'ADN

Les radiations ionisantes, divers agents oxydants ou même des métabolites cellulaires sont capables de casser les molécules d'ADN ; en l'absence de toute réparation, les chromosomes seraient rapidement réduits à l'état de petits fragments. Deux systèmes distincts de raboutage des extrémités ont été mis en évidence. Le premier, qualifié de « non homologue », permet de recoller les extrémités des chromosomes, après élimination de quelques bases, grâce à une ligase. Lorsqu'il concerne une séquence codante (ARN ou protéine), ce type de réparation conduit donc potentiellement à des **mutations**. Mais, dans la mesure où ces séquences ne représentent qu'une part souvent infime (quelques %) de l'ensemble du génome de la plupart des Eucaryotes (voir chapitre 4), cette solution d'urgence reste une réponse acceptable pour conserver l'intégrité des chromosomes. En cas de cassures multiples de l'ADN, le fait que les extrémités raccordées soient indifférentes peut conduire à des translocations réciproques. Le second mécanisme, qualifié « d'homologue », fonctionne essentiellement chez les cellules diploïdes, et utilise le fait que le chromosome homologue puisse servir de repère et de matrice pour reconstituer la séquence originelle des fragments séparés. Le détail des phénomènes mis en jeu, qui reposent sur la recombinaison génétique, ne peut être décrit dans le cadre de cet ouvrage.

4. La mitose chez les cellules animales et végétales

Pendant l'**interphase**, définie comme la période du cycle cellulaire correspondant à l'intervalle de temps situé entre deux **divisions**, le noyau présente l'aspect typique décrit dans le chapitre 8,

avec son enveloppe, son réseau de chromatine et ses nucléoles ; lorsque la cellule entre en division, des modifications profondes affectent tout d'abord cette organisation. La **mitose** au sens strict désigne l'ensemble des événements nucléaires se déroulant lors de la division cellulaire ; par extension, on tend actuellement à confondre mitose et division. Comme nous le verrons plus loin, la durée de la division ne représente en général qu'une faible partie du cycle complet, soit une à deux heures dans les cellules animales en culture, par exemple.

Au sein de la chromatine interphasique, les molécules d'ADN des différents chromosomes, plus ou moins condensées grâce à des protéines, sont étroitement enchevêtrées en un réseau tridimensionnel dans lequel aucune organisation discontinue n'est cytologiquement détectable. On rappelle cependant qu'il existe des méthodes très douces d'isolement de l'ADN permettant d'obtenir, après électrophorèse, des molécules longues de plusieurs millions de paires de bases, correspondant chacune à une chromatide (voir l'exemple de la levure, décrit dans le chapitre 3).

La mitose consiste dans la réorganisation de la chromatine en un ensemble de particules denses ayant les mêmes propriétés de colorabilité qu'elle, en général allongées et apparaissant dédoublées : les **chromosomes métaphasiques**. La séparation en deux parties strictement identiques de ces structures est suivie de leur répartition égale dans les noyaux des deux cellules-filles. Ce processus apparaît bien comme le moyen mécanique de distribuer sous forme condensée, sans erreur, la même information génétique dans les deux produits de la division. On appelle **cytodiérèse** le partage du cytoplasme en deux parties égales, lorsque les événements nucléaires sont achevés. Pendant la division, la plupart des activités cellulaires autres que celles dévolues à la ségrégation des chromosomes et au partage du cytoplasme sont pratiquement stoppées ; cela concerne en particulier tout ce qui touche à l'expression du génome, à la synthèse des protéines et à leur transit intracellulaire.

L'observation de ces phénomènes fascine depuis longtemps les biologistes, en raison de leur aspect dynamique spectaculaire, par opposition à l'aspect plutôt statique des cellules en interphase. Avant d'analyser en détail les différentes étapes de la division cellulaire, nous allons examiner les caractéristiques morphologiques et structurales des chromosomes métaphasiques qui s'individualisent progressivement au cours de la prophase. Les premières mitoses furent décrites vers 1875-1880 simultanément dans les cellules animales et végétales (Strasburger, Flemming) ; le terme de chromosome date de 1888 (Waldeyer).

4.1. Organisation des chromosomes métaphasiques

Le degré de condensation et la visibilité maximales des chromosomes sont atteints à la **métaphase** de la mitose. C'est à ce stade qu'ils illustrent le mieux l'organisation discontinue du génome eucaryotique dont il a été question plus haut ; c'est aussi à ce stade qu'ils sont les plus faciles à analyser par simple écrasement de la cellule, car l'enveloppe nucléaire a disparu et ils s'étalent sans problème dans les préparations cytologiques. À titre d'exemple, on rappelle que chez l'Homme, les 46 chromosomes du noyau de chaque cellule somatique représentent en tout près de 2 m d'ADN. La molécule d'ADN constitutive d'un chromosome moyen y est compactée d'un facteur 10^4 environ, car on passe en effet d'une molécule de 4-5 cm de long (l'ADN nu) à une structure de 4-5 µm de long (le chromosome condensé) ; dans le même temps, on passe d'une fibre de 2 nm de diamètre à une structure ayant une épaisseur d'environ 1 µm.

4.1.1. Morphologie des chromosomes métaphasiques

Les chromosomes métaphasiques sont des structures doubles résultant de la duplication, pendant l'interphase, des chromosomes initialement reçus par la cellule lors de la division précédente (voir *figure* 12.9). Ils sont constitués de deux **chromatides-sœurs** identiques, étroitement accolées sur toute leur longueur, mais distinctes ; leur seul point d'attache, qui est donc une zone non encore dupliquée à ce stade, est constitué par le **centromère** (constriction primaire). On parle de chromosomes « fissurés, ou clivés » en deux chromatides ; le centromère délimite deux **bras chromosomiques**, dont les extrémités sont les **télomères**. À la fin de la métaphase, marquée par la division du centromère, chaque chromatide acquiert son individualité et devient à son tour un chromosome (dont chacune des cellules-filles héritera). On voit que le terme de chromosome est un peu ambigu ; il faut surtout retenir que la structure de base est la chromatide, long filament d'ADN plus ou moins recouvert de

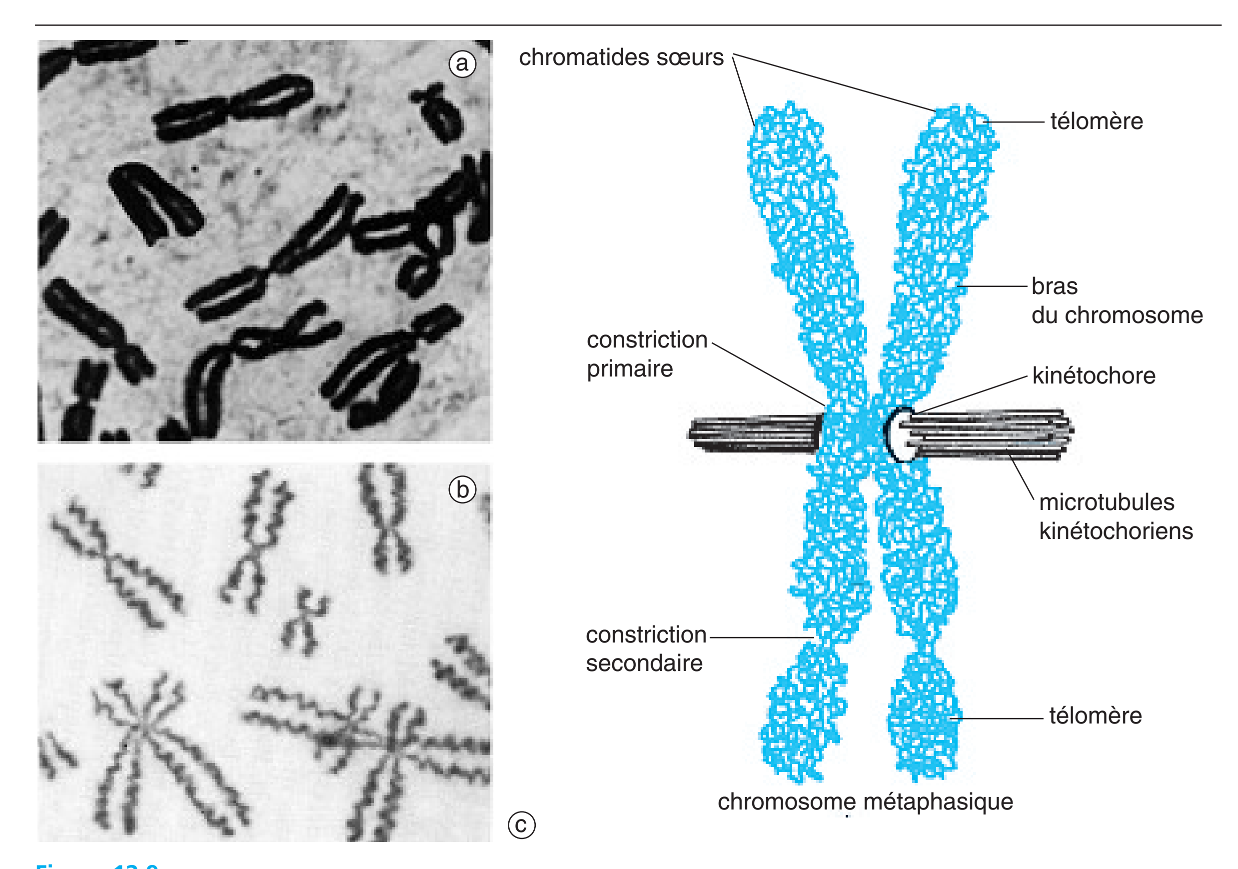


Figure 12.9

Chromosomes observés en microscopie photonique

(a) Aspect classique de chromosomes métaphasiques de cellule animale avec leurs deux chromatides parallèles et compactes. **(b)** Aspect en ressort à boudins des chromosomes d'une cellule végétale en anaphase. **(c)** Schéma d'un chromosome montrant ses différents éléments constitutifs. D'après des clichés de J.C. Lacroix et de A. Sparrow.

protéines, et plus ou moins condensé au cours du cycle cellulaire.

Les chromosomes possèdent parfois une constriction caractéristique supplémentaire (dite secondaire) correspondant à l'emplacement d'un nucléole en période interphasique ; il s'agit de l'**organisateur nucléolaire**, dont la structure et le fonctionnement ont été décrits dans le chapitre 8. Dans certains cas, les constrictions secondaires correspondent à des régions qui sont déphasées par rapport au reste du chromosome, lors de sa condensation. Ces segments peu condensés à la métaphase continuent à augmenter d'épaisseur au stade suivant et restent condensés durant toute l'interphase, constituant alors des régions hétérochromatiques.

Divers traits morphologiques permettent d'identifier et de classer sans ambiguïté les chromosomes métaphasiques. Le premier critère retenu est leur longueur, qui varie au sein d'une même espèce de quelques µm à plusieurs dizaines de µm ; certains sont extrêmement courts, et dits punctiformes (moins de 1 µm, chez des Papillons qui ont un nombre élevé de chromosomes), alors que d'autres dépassent 30 µm (chez diverses Liliacées, par exemple). Un deuxième mode de classement est basé sur la position du centromère ; les deux bras pouvant être de longueur différente, on définit un paramètre nommé **indice centromérique**, mesuré par le rapport entre la longueur du bras le plus court et la longueur totale du chromosome. La description du nombre, de la forme, et de toute particularité visible des chromosomes permet d'établir un **caryotype**, qui constitue la carte d'identité chromosomique d'une espèce donnée (voir plus loin) ; ces études sont à la base d'une discipline appelée **cytogénétique**.

4.1.2. Ultrastructure et architecture moléculaire des chromosomes métaphasiques

La condensation des chromatides en fin de prophase correspond à un enroulement hélicoïdal, visible en microscopie optique dans quelques cas particuliers (voir *figure* 12.9). La microscopie à balayage (voir chapitre 2) montre, à la surface des chromosomes métaphasiques, une multitude de protubérances ovoïdes plus ou moins allongées, dont l'épaisseur est voisine de 60 nm. Quand les chromosomes sont légèrement désorganisés par une déprotéinisation partielle, l'architecture de ces structures est plus visible : ce traitement fait apparaître, à leur place, de courtes boucles constituées d'une fibre épaisse de 30 nm. Or, on sait que la fibre élémentaire de nucléosomes s'organise au sein de la chromatine en une superstructure hélicoïdale de 30 nm de diamètre (modèle en solénoïde stabilisé par l'histone H1 ; voir chapitre 8). C'est donc probablement le même niveau de condensation de l'ADN qui existe dans la chromatine et dans le chromosome métaphasique.

Les chromosomes peuvent être totalement désorganisés par élimination complète des histones, puis étalés sur des grilles de microscopie électronique. On observe alors une sorte de squelette axial fibreux dont la taille et la forme correspondent à peu près à celles des chromosomes de départ, et d'où émergent des milliers de boucles enchevêtrées d'ADN, ayant de 15 à 30 µm de long. La zone axiale qui résiste au traitement est constituée de protéines non-histones. Le modèle d'organisation du chromosome métaphasique est actuellement le suivant : autour d'un axe protéique épais ayant un rôle de squelette rigide, des boucles constituées d'une fibre de 30 nm pelotonnée sur elle-même sont disposées en une hélice continue. Ces boucles sont pontées à leur base et stabilisées par des protéines. On passe ainsi progressivement d'une structure linéaire extrêmement longue (la fibre de 11 nm) à une structure très courte et compacte, grâce à une série de niveaux d'organisation superposés.

Un autre élément caractéristique des chromosomes, observable sur les coupes ultrafines, est constitué par le **kinétochore** (voir *figure* 12.10). Il s'agit d'une structure complexe, apparaissant en général sous la forme d'une plaque trilaminaire étroitement accolée au centromère de chaque chromatide. Les deux kinétochores d'un chromosome métaphasique sont orientés dans deux directions opposées ; ils servent de lieu d'ancrage à des microtubules. Chez les chromosomes humains, une trentaine de microtubules parallèles y sont accrochés, alors que chez certains micro-organismes (comme la levure de bière), on en compte un seul. L'information qui détermine la mise en place du kinétochore en un endroit unique de la chromatide vient directement de la séquence d'ADN contenue au niveau du centromère. Chez la levure, où la situation est simple, l'ADN centromérique est bien identifié (et même séquencé) pour les 16 chromosomes du génome ; ces courts segments d'ADN, d'environ 100 paires de bases, fixent spécifiquement des protéines permettant la formation des complexes multiprotéiques que constituent les kinétochores. Le rôle de ces derniers dans les mouvements des chromosomes lors de la division sera examiné plus loin.

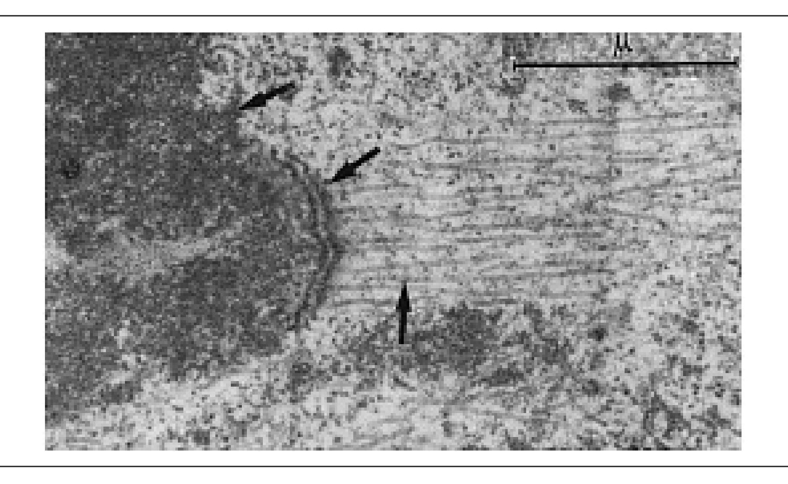


Figure 12.10

Le kinétochore des cellules animales

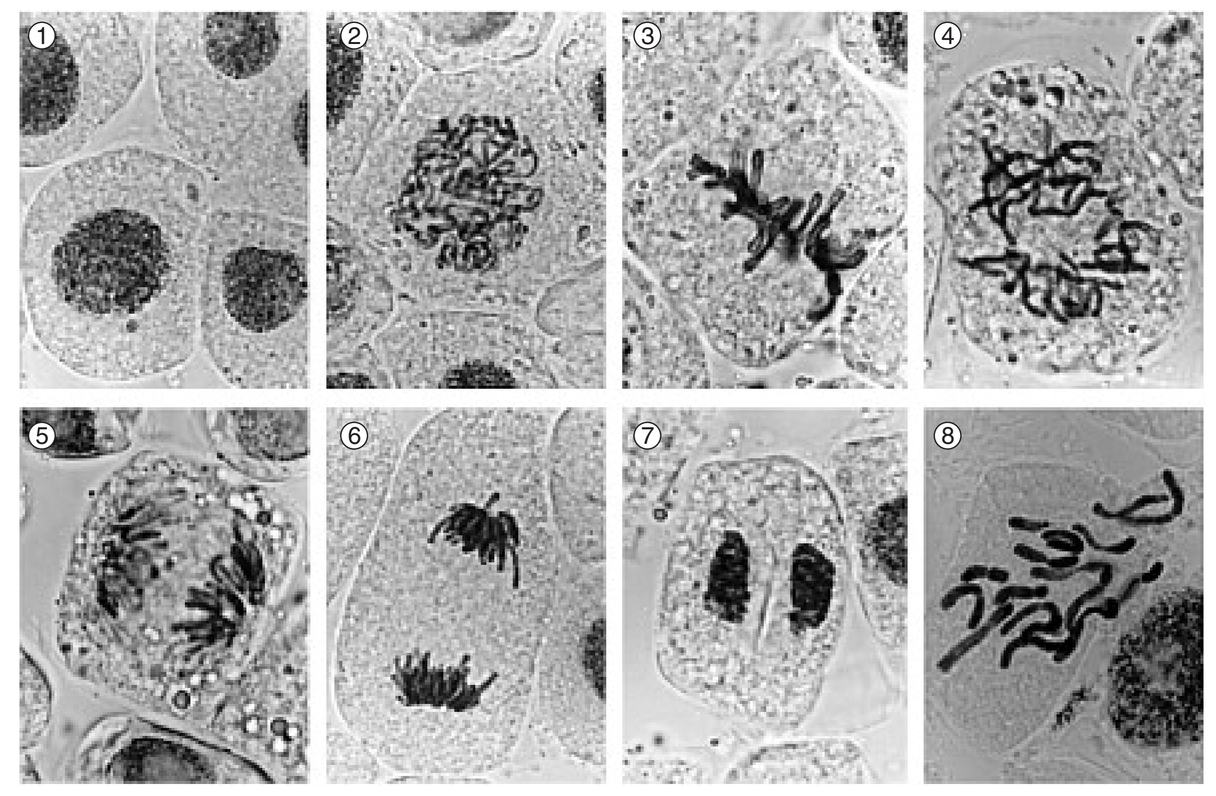
Noter la structure trilaminaire de la plaque kinétochoriale dans laquelle s'accrochent perpendiculairement les microtubules (microscopie électronique ; chromosome en anaphase). Cliché Labo. BG., Orsay.

4.2. Mitose et cytodiérèse des cellules animales

4.2.1. Étapes cytologiques de la mitose

Les événements nucléaires de la division sont découpés en cinq stades qui s'enchaînent de façon continue, de sorte qu'il n'est pas toujours facile de trouver une frontière nette entre eux (voir *figure* 12.11). Ces stades, dont les durées sont très différentes, sont nommés : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase (le principe de leur mesure sera exposé plus loin). Il existe, dans les divers groupes d'Eucaryotes, de nombreuses variantes à tous les stades de la division cellulaire (en particulier en ce qui concerne la prophase), et nous en décrirons quelques unes.

• **Prophase** : le passage de l'état interphasique à l'état prophasique n'est pas cytologiquement défini de façon très nette au sein du noyau : la chromatine diffuse se condense progressivement en chromosomes qui apparaissent sous la forme de fins filaments devenant de plus en plus visibles. Ce processus s'accompagne d'un léger gonflement du noyau et de son éclaircissement global lorsqu'on le traite par les colorants de la chromatine. À la fin de ce stade, qui dure de 20 à 30 minutes, les chromosomes bien individualisés ont pratiquement atteint leur raccourcissement maximum. On doit aussi signaler la disparition progressive du (ou des) nucléole(s), en raison de l'arrêt du fonctionnement des gènes des organisateurs nucléolaires (voir chapitre 8). La fin de la prophase est marquée par la rupture de l'enveloppe nucléaire ; celle-ci se disperse en une multitude de vésicules membranaires qui ne sont plus distinguées de celles issues du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. L'événement majeur responsable de la fragmentation de l'enveloppe est la phosphorylation des protéines constitutives de la lamina nucléaire (voir plus loin). La modification de la conformation de ces protéines entraîne la perte de leurs interactions réciproques, ainsi que celles qu'elles contractaient



1. Interphase - **2.** Prophase - **3** et **4.** Métaphases en vue latérale et polaire - **5** et **6.** Anaphases - **7.** Télophase - **8.** Stock chromosomique de *Allium cepa* (2n = 16).

Figure 12.11

Différents stades de la mitose dans des cellules de méristème de racine d'oignon

Coloration de l'ADN par la méthode de Feulgen. Clichés J. Orcival, Orsay.

avec d'autres protéines membranaires. De même que les lamines, les éléments constitutifs des pores nucléaires passent aussi en solution. Les phénomènes exactement inverses se dérouleront à la télophase, lors de la reconstitution du noyau.

• **Prométaphase** : cette phase débute lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, lorsque les éléments du **fuseau de division** (parfois appelé **fuseau achromatique**, ou bien **fuseau mitotique**, bien qu'il fonctionne également lors de la méiose), jusque-là confinés à l'extérieur du noyau, envahissent l'espace qu'il occupait précédemment. Des événements très importants, liés aux rapports que cette structure contracte avec les chromosomes, seront détaillés plus loin. L'examen de cellules vivantes en microscopie photonique montre un extraordinaire ballet de chromosomes, qui présentent des mouvements désordonnés et semblent se déplacer au hasard entre les deux pôles de la cellule. Contrairement à la précédente, cette phase est très courte et dure seulement quelques minutes ; le résultat est cependant capital : après cette brève période d'intense activité, les chromosomes fissurés s'alignent enfin sur un seul plan (la **plaque équatoriale** ou **plaque métaphasique**), leurs kinétochores étant orientés chacun en direction des pôles, de sorte que les mouvements ultérieurs des chromosomes seront parfaitement dirigés.

• **Métaphase** : cette période correspond à la stabilisation des chromosomes sur le plan situé à mi-chemin entre les pôles des cellules ; celle-ci résulte de l'équilibrage, grâce à des mécanismes inconnus, des forces qui tendent à les déplacer d'un côté ou de l'autre du plan équatorial. Nous verrons plus loin qu'il s'agit d'un équilibre dynamique et que les chromosomes sont en fait sous tension. Cependant, si on détruit expérimentalement (au moyen d'un fin pinceau de lumière laser) un faisceau de microtubules associant un kinétochore à son pôle fusorial, le chromosome entier se dirige instantanément vers le pôle auquel il reste attaché. De même, si on rompt le lien qui réunit les chromatides-sœurs au niveau du centromère, celles-ci se séparent immédiatement et migrent vers les pôles opposés comme dans le cas d'une anaphase normale ; ceci indique que le moteur caractéristique de cette dernière phase est déjà en place lors de la métaphase. Curieusement, et bien qu'il ne se passe apparemment rien dans la cellule, cette phase a une durée importante : 20 à 40 min ; comme nous le verrons plus tard, ceci signifie que la cellule «vérifie» un certain nombre de paramètres avant d'engager la phase finale et cruciale de la mitose, qui conduira à distribuer exactement la même information génétique dans les deux cellules-filles.

• **Anaphase** : le début de cette phase est marqué par le clivage des centromères ; elle ne démarre que si tous les chromosomes sont correctement disposés sur le plan équatorial. Les deux chromatides-sœurs se séparent et entament leur migration individuelle vers chaque pôle de la cellule. Les figures d'anaphase sont très caractéristiques, car on observe deux paquets symétriques de chromosomes se dirigeant, centromère en avant, vers les pôles de la cellule. Le mécanisme à la base de ce mouvement sera analysé plus loin, mais on peut déjà dire qu'il résulte de deux phénomènes superposés : le raccourcissement des fibres kinétochoriennes, qui les accrochent aux pôles, et l'allongement du fuseau lui-même. L'anaphase est une période brève (5-10 min), car les chromatides se déplacent globalement à la vitesse de 1 µm par minute environ. À la fin de ce stade, les deux ensembles de chromatides-sœurs sont rassemblés aux deux pôles de la cellule ; le résultat majeur de la mitose est atteint, puisque le matériel génétique est distribué en deux lots identiques. Il ne reste plus qu'à diviser le cytoplasme en deux cellules-filles, mais auparavant on observe la reconstitution des noyaux et le retour vers une situation de chromatine interphasique.

• **Télophase** : les microtubules kinétochoriens ont disparu et les kinétochores eux-mêmes commencent à se désassembler. L'enveloppe nucléaire se reconstitue autour des paquets de chromosomes selon un processus inverse de celui décrit pour la fin de la prophase, et qui dure de 10 à 30 minutes. On assiste ensuite à une décondensation des chromatides dans le nouveau noyau et à un retour à une situation de chromatine plus ou moins diffuse ; en parallèle, les nucléoles réapparaissent au niveau des différents organisateurs nucléolaires, avant de fusionner en un nombre limité de structures (une ou deux). La partie nucléaire de la division cellulaire, la mitose proprement dite, est terminée avec la fin de la télophase. Nous examinerons la cytodiérèse un peu plus tard, après avoir étudié les mécanismes du mouvement des chromosomes.

4.2.2. L'appareil mitotique des cellules animales

Jusqu'à présent, nous avons seulement évoqué le rôle du fuseau mitotique ; son origine, sa mise en

place et son fonctionnement complexes justifient que l'on consacre un développement séparé à leur sujet. Chez les cellules animales, le fuseau fait partie d'un ensemble complexe appelé **appareil mitotique**, qui provient de la réorganisation profonde du cytosquelette interphasique, et dans lequel on distingue trois catégories de microtubules (voir *figure* 12.12).

- **Origine de l'appareil mitotique**

L'unique centre organisateur de microtubules des cellules animales est le **centrosome**, petite structure juxtanucléaire décrite dans le chapitre 11. C'est au sein du matériel amorphe entourant les deux centrioles que s'organisent tous les microtubules ; c'est là que s'enracine leur extrémité (–), qui est ainsi protégée de toute dépolymérisation, leur extrémité (+) pouvant en revanche s'allonger ou se raccourcir librement. Dès le début de la mitose, tous les microtubules rayonnants et dynamiques qui emplissent le hyaloplasme des cellules interphasiques se dépolymérisent (ce qui contribue à modifier la forme des cellules isolées en culture), et la tubuline libre ainsi disponible est utilisée pour construire les **asters**. Ces structures, qui rayonnent autour de chaque centrosome (dont la duplication a déjà eu lieu à ce stade), sont constituées initialement de nombreux microtubules courts. Dans la

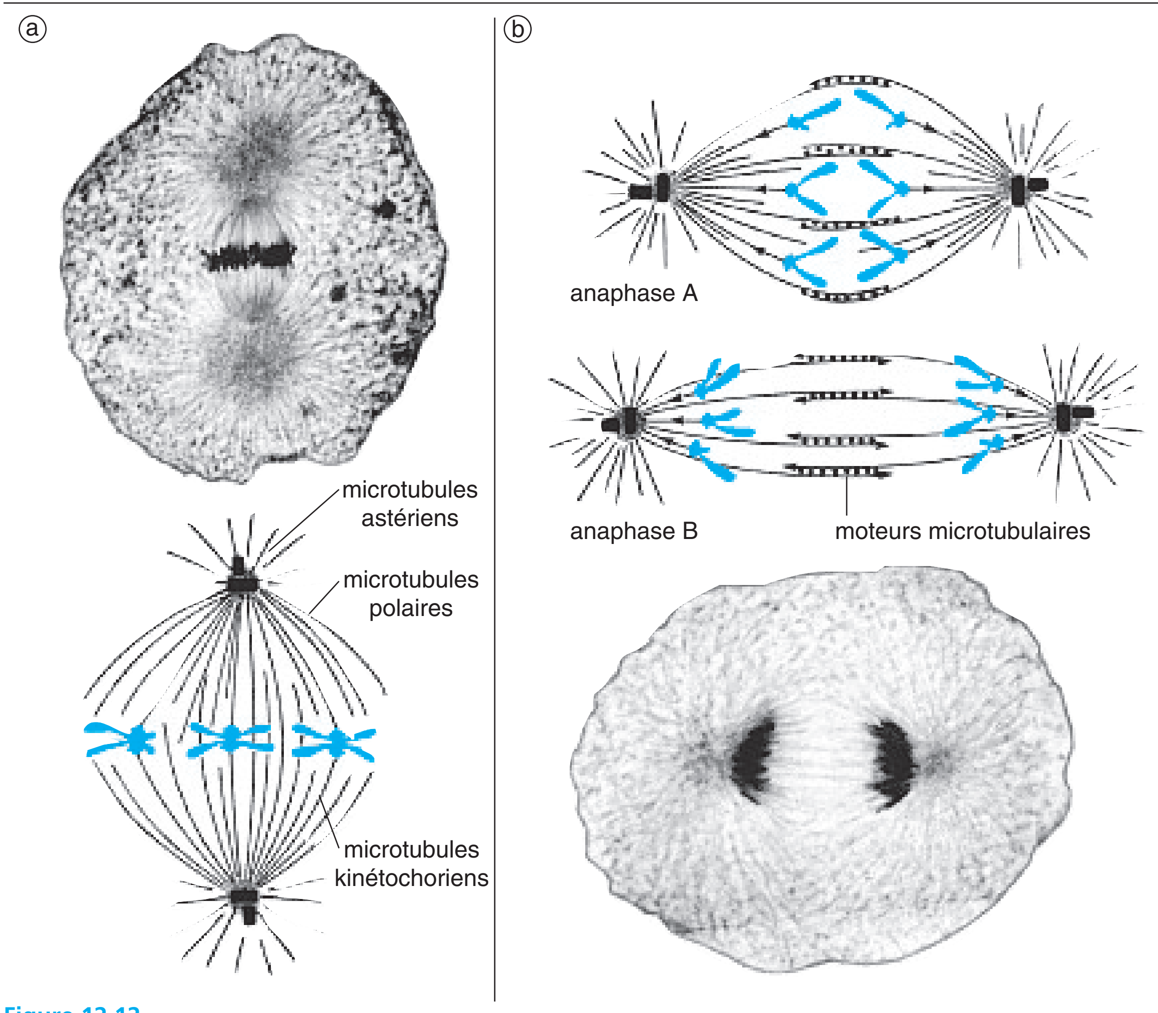


Figure 12.12

L'appareil mitotique des cellules animales

(a) Coupe de cellule embryonnaire de poisson en métaphase et schéma interprétatif (cliché Turtox). **(b)** Schémas illustrant le rôle de l'anaphase A et de l'anaphase B dans la séparation des chromosomes dans une cellule animale (les moteurs de type dynéine, situés aux extrémités des microtubules astériens, ne figurent pas sur ce schéma) ; coupe de cellule embryonnaire de poisson en anaphase.

région où les deux asters sont en contact, les **microtubules astériens** tendent à se repousser, à mesure qu'ils s'allongent, ce qui éloigne les deux centrosomes-frères l'un de l'autre et leur donne, en fin de prophase, une disposition diamétralement opposée dans la cellule, par rapport au noyau.

• Cycle centrosomique

Le centrosome subit un cycle précis au cours de la vie de la cellule, puisqu'il est impliqué dans la formation du fuseau mitotique et qu'il doit aussi se diviser pour passer dans les deux cellules-filles. La duplication des deux centrioles formant le cœur de l'unique centrosome dont hérite toute cellule animale après la division a lieu pendant l'interphase suivante ; elle commence dès le début de la phase de synthèse de l'ADN dans le noyau (dite S ; voir plus loin). Chaque centriole engendre alors un court centriole-frère qui lui est perpendiculaire et qui s'allonge pendant toute la durée de cette phase, jusqu'à atteindre sa longueur normale ; les mécanismes moléculaires responsables de la nucléation du nouveau centriole restent inconnus. Pendant toute la période qui suit, jusqu'à la mitose suivante (phase dite G2), la cellule possède donc deux centrosomes étroitement accolés l'un à l'autre et non visibles individuellement en microscopie photonique.

• Mise en place et rôle du fuseau mitotique

Après la disparition de l'enveloppe nucléaire, chaque centrosome devient un pôle du fuseau mitotique qui se met immédiatement en place, comme on l'a vu plus haut. Son organisation complexe est basée sur l'existence de deux types de microtubules : les **microtubules polaires**, qui se rejoignent et se chevauchent au niveau du plan équatorial (mais ne sont pas en continuité), et les **microtubules kinétochoriens**, qui captent les chromosomes. Le fuseau est donc constitué de deux demi-fuseaux symétriques ; les microtubules polaires des deux moitiés du fuseau entrent en contact et se stabilisent mutuellement grâce à des interactions encore mal connues, établies au niveau de leurs extrémités (+). Celles-ci étant protégées, ces microtubules ne se polymérisent plus et forment une sorte de cage rigide qui servira ultérieurement à assurer le mouvement des chromosomes pendant l'anaphase. Deux phases sont actuellement distinguées au cours de cette période : l'**anaphase A**, sur laquelle nous reviendrons plus loin, et l'**anaphase B** qui nous intéresse ici. Au cours de cette dernière, les microtubules polaires s'allongent à nouveau par leur extrémité (+), au niveau de chacun des deux demi-fuseaux, mais la zone de chevauchement reste constante. Le glissement des microtubules adjacents et opposés est assuré de façon active par des **moteurs moléculaires** du même type que ceux décrits dans le chapitre 11 (de type **kinésine**). L'allongement global de la cellule qui en découle entraîne donc l'éloignement progressif des deux pôles du fuseau, ce qui contribue évidemment à la séparation efficace des deux lots de chromosomes. Dans les cellules animales, le fuseau s'allonge d'un facteur 1,5 à 2, mais chez certains Protozoaires cet allongement peut atteindre 15 fois sa valeur mesurée en métaphase. On a aussi démontré l'intervention d'autres moteurs (de type **dynéine**), ancrés dans la membrane plasmique, et qui participent au raccourcissement des fibres astériennes.

• Rôle des kinétochores au cours de la mitose

Le rôle de ces structures est de capturer l'extrémité (+) de certains microtubules du fuseau, ce qui aura pour conséquence ultime de placer les chromosomes en position équatoriale dans la cellule, à la métaphase. Au début de la prométaphase, le kinétochore d'une chromatide capture tangentiellement un microtubule, de façon aléatoire ; le chromosome ainsi fixé migre vers le pôle de la cellule correspondant à ce microtubule, en glissant tout du long grâce à des moteurs moléculaires de type **dynéine**. D'autres microtubules sont progressivement capturés par ce même kinétochore (de façon terminale, cette fois-ci), ce qui accentue le mouvement. Cependant, la fixation par le kinétochore de la chromatide-sœur de nouveaux microtubules issus du pôle opposé de la cellule, rétablit l'équilibre et ramène le chromosome vers le plan équatorial.

Il est démontré que, pendant la métaphase, les microtubules kinétochoriens continuent de s'allonger par incorporation de tubuline au niveau de leur extrémité (+), et que leur longueur constante est maintenue par une dépolymérisation équivalente au niveau des centrosomes ; ceci conduit donc à une tension de part et d'autre des chromosomes au sein du fuseau. Les microtubules kinétochoriens se renouvellent ainsi en permanence et leurs monomères sont progressivement repoussés vers les pôles de la cellule (principe du tapis roulant ; voir chapitre 11). Pendant l'anaphase, et en particulier pendant la phase A, la dynamique de la

tubuline est profondément modifiée au niveau des kinétochores ; ceux-ci deviennent alors un lieu de dépolymérisation rapide des microtubules, ce qui entraîne leur raccourcissement et le mouvement des chromatides vers les pôles. On ignore tout du mécanisme grâce auquel, dans ces conditions, les chromatides restent accrochées aux extrémités instables (+) et suivent le mouvement général de celles-ci vers les pôles ; il semble en effet difficile de concilier une dépolymérisation tout en maintenant un accrochage solide entre microtubule et kinétochore. On peut, de façon imagée, considérer que le kinétochore « digère » les microtubules tout en avançant vers le pôle.

On comprend ainsi comment les chromosomes-frères sont éloignés l'un de l'autre et comment ils rejoignent les pôles : l'allongement du fuseau et le raccourcissement simultané des microtubules kinétochoriens en sont responsables. La contribution relative de ces deux mécanismes varie en fait considérablement selon les groupes d'Eucaryotes. Il faut enfin souligner que tous ces mouvements n'ont rien à voir avec les systèmes contractiles impliquant l'actine ou la myosine, puisque des inhibiteurs spécifiques de ces protéines (anticorps, ou drogues telles que la phalloïdine) n'ont aucun effet sur les déplacements des chromosomes au cours de l'anaphase.

4.2.3. La cytodiérèse

Cette phase, appelée aussi **cytocinèse**, correspond au partage du cytoplasme consécutif à la mitose, de sorte que chaque cellule-fille hérite d'un stock complet de molécules et d'organites.

• Rôle des filaments d'actine et de myosine

Les cellules animales se divisent en mettant en œuvre un **sillon de division** qui entraîne un pincement du cytoplasme. Ce sillon partage habituellement la cellule initiale en deux moitiés égales, puisqu'il se localise invariablement au niveau du plan équatorial déterminé par le fuseau mitotique. La cytodiérèse commence au cours de l'anaphase et elle se poursuit pendant la durée de la télophase, voire le début de l'interphase suivante. Le mécanisme mis en jeu implique l'intervention d'un anneau contractile étroit situé sous la surface de la membrane plasmique, constitué de l'association de molécules d'**actine** et de **myosine**, et fonctionnant à la manière d'un sphincter. Comme dans les sarcomères du muscle strié, la force de contraction est engendrée par le glissement des filaments de myosine le long de ceux de l'actine ; le détail des mécanismes est mal connu mais l'action de drogues spécifiques ne laisse aucun doute sur la nature des molécules impliquées. De même, l'injection d'anticorps antimyosine dans les œufs d'oursins en division entraîne la disparition du sillon de division sans affecter les événements nucléaires.

La dernière phase de la cytodiérèse sépare les deux cellules-filles, qui restent un moment réunies par un fin pont cytoplasmique contenant un faisceau de microtubules résiduels (dits interzonaux) provenant du fuseau mitotique ; cette structure est appelée **corps intermédiaire** (voir *figure* 12.13). Nous verrons plus loin que la cytodiérèse des cellules végétales se déroule de façon très différente, en raison de la paroi cellulosique, contre laquelle la membrane plasmique est étroitement accolée.

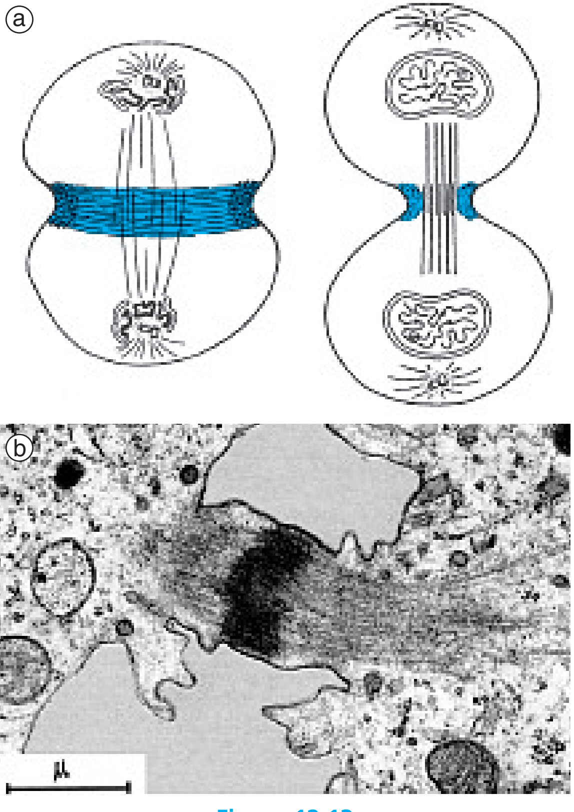


Figure 12.13

La cytodiérèse des cellules animales

(a) Formation du sillon de division, impliquant un anneau contractile d'actine et de myosine. **(b)** Corps intermédiaire observé en microscopie électronique et montrant les microtubules interzonaux. Cliché Labo. BG, Orsay.

• **Partage égal ou inégal des constituants cytoplasmiques**

Outre le matériel génétique nucléaire, tous les autres constituants cellulaires doivent être équitablement répartis dans les cellules-filles. Nous avons vu que les mitochondries (et les plastes dans le cas des Végétaux et des Algues) ne peuvent pas apparaître *de novo* dans des cellules qui n'en posséderaient pas au départ, puisqu'ils sont doués de **continuité génétique** (voir chapitre 4) ; la croissance et la multiplication de ces organites au cours de l'interphase ont été traitées dans les chapitres 9 et 10. Lors de la division, toute cellule doit aussi hériter d'un nombre minimum de ribosomes pour pouvoir assurer une synthèse protéique raisonnable, ne serait-ce que pour fabriquer de nouveaux ribosomes, qui contiennent eux-mêmes des protéines ! Il n'y a pas de réel problème à ce sujet car le réticulum endoplasmique, qui s'est désorganisé par vésiculisation au début de la mitose, envahit complètement le cytoplasme, de sorte que le sillon de division le partage inévitablement. Il en va de même pour tous les organites présents en grand nombre dans le cytoplasme, et il n'est pas nécessaire d'imaginer de mécanisme particulier pour assurer leur ségrégation. Les seuls cas délicats sont ceux du centrosome, présent au départ en un seul exemplaire dans la cellule animale, et dont nous avons annoncé que sa division précède en fait celle du noyau, et celui du chloroplaste unique (et géant) de certaines espèces d'Algues. Ici aussi, la division de l'organite précède toujours la cytodiérèse, grâce à des contrôles encore mal connus.

À côté de cette situation courante, on connaît de nombreux exemples de **divisions asymétriques** liées au développement et à la différenciation (voir chapitre 14). C'est le cas classique des segmentations inégales observées au cours du développement précoce des embryons d'Invertébrés ou de Vertébrés inférieurs. Une belle illustration de ceci est fournie par la répartition, dans les différents blastomères issus du clivage de l'œuf, de composants reconnaissables en cytologie par leur aspect ou leur couleur ; l'exemple le plus démonstratif est celui des embryons d'ascidie (embranchement des Urocordés). Le devenir des cellules ainsi «marquées» est rigoureusement déterminé et on montre, par des expériences de destruction sélective, que chacune d'elles fournit normalement une partie bien précise de la jeune larve ; on parle alors d'**œufs-mosaïque**. Dans la plupart des cas, le cytoplasme de l'œuf est hétérogène avant toute division cellulaire ; cette répartition inégale n'est cependant pas toujours passive car on connaît des exemples où des composants uniformément répartis dans l'œuf se trouvent ensuite concentrés à un pôle cellulaire et systématiquement associés à un nombre limité de cellules, lors de la segmentation. C'est de cette façon que les cellules de la lignée germinale, chez divers Animaux (certains Insectes, Amphibiens ou Nématodes), héritent très précocement de granules denses contenus dans l'œuf, et qui ont été mis en rapport direct avec la destinée sexuelle qui les caractérise (**plasme germinal**).

Enfin, la distinction entre cellules immortelles et cellules destinées à se différencier (et à mourir, faute de descendance) est souvent le résultat de divisions asymétriques et du partage inégal de constituants cytoplasmiques. Bien que le mécanisme soit un peu différent, on peut rapprocher de ceci le cas des **cellules souches** qui sont à l'origine de certains tissus à croissance continue : épithélium intestinal, cutané, tissus glandulaires (voir chapitres 13 et 14).

• **Découplage entre mitose et cytodiérèse**

Il faut enfin signaler qu'il existe de nombreux cas où la division du noyau est désynchronisée par rapport à celle du hyaloplasme : dans les embryons précoces d'Insectes, par exemple, de nombreux cycles de division nucléaire conduisent, en l'absence de segmentation, à une seule cellule géante contenant jusqu'à 8 000 noyaux distribués de façon périphérique. Chez les Vertébrés, on peut citer des exemples de cellules binucléées (certains hépatocytes), ou bien plurinucléées (ostéoclastes). Les phénomènes d'**endoréplication** conduisant aux chromosomes polyténiques, ou ceux à l'origine de la polyploïdie (mégacaryocytes), relèvent de mécanismes voisins bien que tout se passe alors au sein d'un même noyau (voir chapitre 8).

4.3. Particularités de la mitose chez les Végétaux supérieurs

4.3.1. Absence de centrosome et mouvements spécifiques des microtubules

Les Végétaux supérieurs (les Angiospermes et la plupart des Gymnospermes) ne possèdent pas de centrioles comme centres organisateurs de microtubules ; ces structures se rencontrent en revanche chez les Végétaux inférieurs : les Mousses

et les Fougères (dans leurs gamètes mâles), ainsi que chez certaines Algues et Champignons. Lors de la division cellulaire, le comportement des microtubules est donc spécifique et très original chez les Végétaux supérieurs ; leur rôle dans l'orientation du plan de clivage est déterminant, comme dans les cellules animales, mais les mécanismes mis en jeu sont fondamentalement différents.

Nous avons vu dans le chapitre 11 que le cytosquelette interphasique de ces cellules est constitué de microtubules corticaux organisés en anneaux serrés ou en hélices, en général perpendiculaires au grand axe de la cellule. Le premier signe avant-coureur de la division est le regroupement de ces microtubules en une ceinture corticale, dite **bande préprophasique**, qui marque le futur plan de clivage (voir *figure* 12.14). Cette structure disparaît au profit de microtubules périnucléaires qui constituent, pendant la prophase, un manchon perpendiculaire au plan précédemment déterminé. Lors de la prométaphase, les microtubules envahissent l'espace nucléaire laissé libre et constituent un fuseau mitotique caractéristique, bien qu'il n'existe pas de fibres astériennes : on parle alors de **mitose**

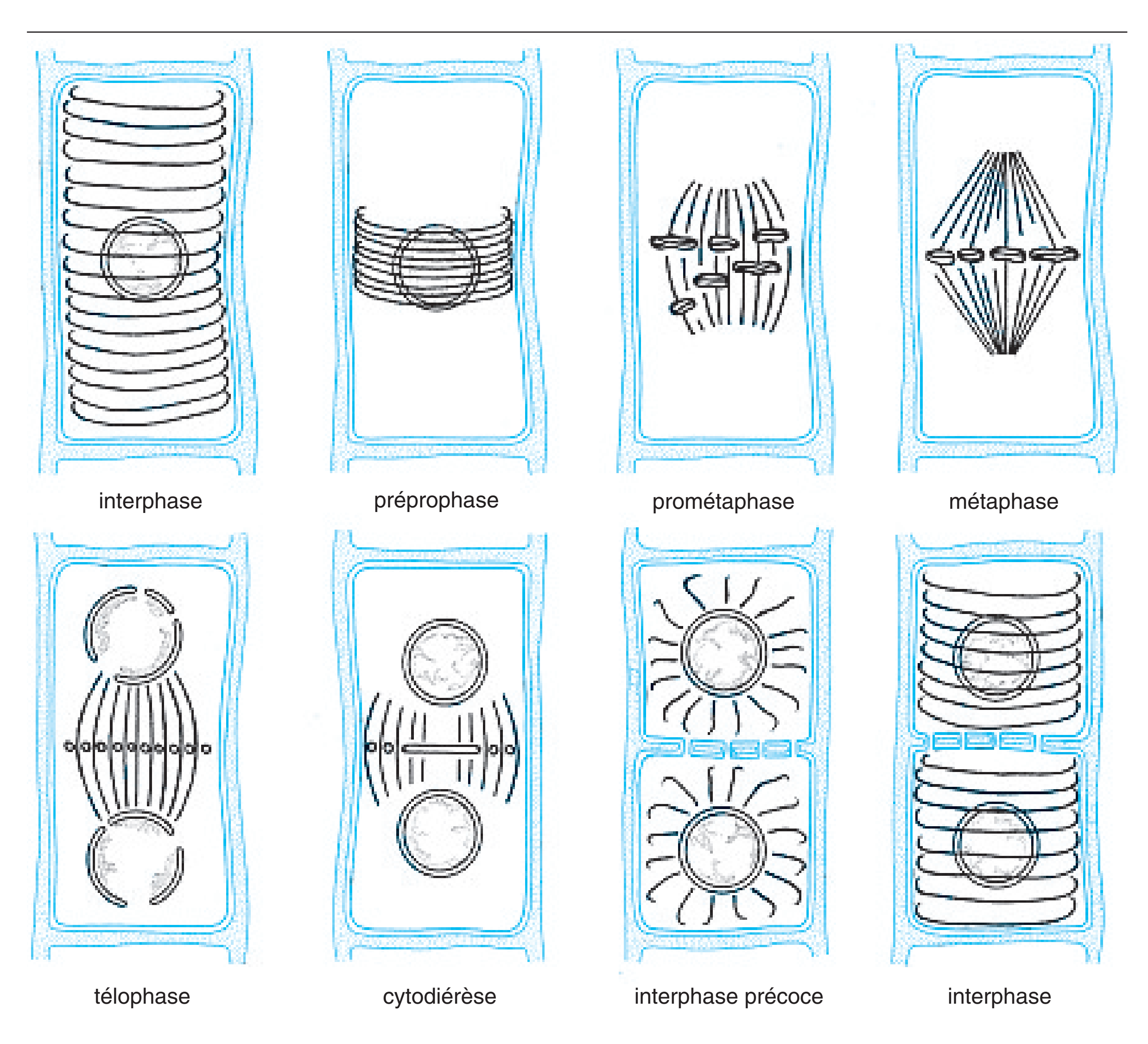


Figure 12.14

Évolution du cytosquelette microtubulaire des cellules végétales au cours du cycle cellulaire

La disposition en anneaux corticaux est caractéristique de l'interphase de ces cellules (voir chapitre 11) ; noter que la mitose est ici anastrale. Au stade de la préprophase, une bande corticale étroite de microtubules marque l'emplacement du futur phragmoplaste.

anastrale. Les microtubules polaires et kinétochoriens s'enracinent dans un territoire hyaloplasmique non différencié.

Lors de la télophase et de la cytodiérèse, les microtubules polaires s'écartent peu à peu de l'axe déterminé par les noyaux-fils et se retrouvent plaqués sous les membranes pariétales ; dans les deux cellules-filles, ils se réorganisent ensuite en hélices ou anneaux corticaux classiques. La position de la bande préprophasique détermine toujours le plan de clivage, quelle que soit sa position par rapport au grand axe de la cellule ; dans le cas des divisions asymétriques (voir plus loin), c'est cette bande qui se déplace en entraînant le noyau, et qui est à l'origine de la formation d'une petite et d'une grande cellule. Le devenir de chaque cellule est ainsi rigoureusement fixé, mais la base de la polarité et des contrôles mis en jeu sont encore inconnus.

4.3.2. Cytodiérèse

La division du cytoplasme des cellules végétales s'effectue, non par pincement comme dans les cellules animales, mais par construction d'une nouvelle paroi séparant les cellules-filles. À la fin de la télophase, les microtubules polaires résiduels, relativement courts, forment une sorte de disque épais situé entre les deux noyaux, appelé **phragmoplaste** ; ils sont accompagnés de nombreux filaments d'actine et de petites vésicules d'origine golgienne. Ces dernières sont guidées par les microtubules vers le plan équatorial, où elles fusionnent les unes avec les autres et constituent alors la **plaque cellulaire**. Le contenu de ces vésicules est formé de précurseurs de la paroi cellulaire (essentiellement de nature polysaccharidique) ; leur membrane sera, en fin de compte, à l'origine de la membrane plasmique de chacune des deux cellules-filles. La plaque cellulaire est donc un disque limité par une membrane, qui s'agrandit de façon centrifuge à mesure que de nouvelles vésicules fusionnent à sa périphérie ; il arrive ainsi un moment où cette structure rencontre les parois latérales de la cellule initiale, ce qui conduit à la fusion des membranes plasmiques, ainsi qu'à la fusion des matériaux de la paroi transversale avec ceux des parois préexistantes (voir *figure* 12.15).

La séparation entre les deux cellules-filles est terminée, et la **lamelle moyenne** qui est ainsi formée contient uniquement des pectines, des hémicelluloses et des protéines. La mise en place de fibrilles de cellulose, selon le mécanisme décrit dans le chapitre 14, viendra ultérieurement et permettra la formation des parois primaires. La cloison transversale ainsi réalisée n'est pas complètement étanche car il persiste des orifices contenant des tubules membranaires qui assurent une communication entre les cellules voisines. Ces fins tubules qui traversent la paroi sont limités par la membrane plasmique ; ils contiennent du cytoplasme et des éléments du réticulum endoplasmique de la cellule initiale, qui ont été emprisonnés lors de la formation de la plaque cellulaire ; ils constituent les **plasmodesmes** (voir chapitre 14).

Comme chez les cellules animales, la division des noyaux n'est pas toujours immédiatement sui-

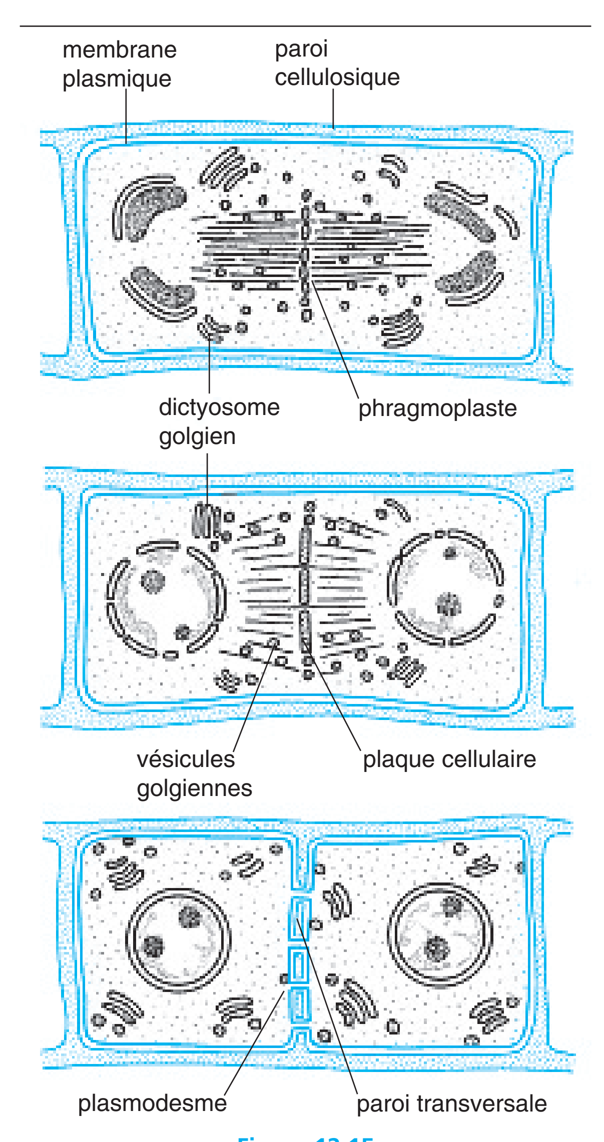


Figure 12.15

La cytodiérèse chez les cellules végétales

Le phragmoplaste et la plaque cellulaire sont les précurseurs de la paroi séparant les cellules-filles.

vie de la cytodiérèse ; on peut citer l'exemple de l'albumen triploïde des graines de nombreuses plantes supérieures, dont la formation implique souvent un passage par une forme syncytiale. De même, les conséquences du partage inégal du cytoplasme chez les Végétaux sont importantes sur le plan du développement des cellules. On connaît plusieurs exemples de divisions asymétriques conduisant à des cellules dont les destinées sont différentes : c'est le cas des cellules allongées de la racine qui sont à l'origine des poils absorbants (la plus petite des deux cellules formées donnant toujours le poil) ou celui des cellules à l'origine des cellules de garde dans les stomates. L'exemple le plus frappant est sans doute celui des **apicales** des filaments à croissance continue observés chez les Algues et les Mousses ; il s'agit de cellules hautement polarisées, possédant une différenciation longitudinale marquée, et dont la division transversale conduit à une distribution très différente des organites dans les cellules-filles. L'apicale fonctionne comme une cellule-souche immortelle donnant naissance à un filament au sein duquel une différenciation se manifestera.

4.4. Diversité des modalités de la division chez les Eucaryotes

Outre les différences qui viennent d'être décrites entre la mitose des cellules animales et celle des cellules végétales, on observe de nombreuses variations chez les autres Eucaryotes : Protistes, Algues et Champignons. Elles portent sur la nature et la localisation des centres organisateurs de microtubules, le devenir de l'enveloppe nucléaire, l'origine du mouvement des chromosomes et les modalités de la cytodiérèse. En ce qui concerne les centres organisateurs de microtubules, il faut signaler par exemple que les Champignons (à l'exception de quelques groupes, dont les Oomycètes), ne possèdent pas de centrioles mais des plaques opaques aux électrons collées à l'enveloppe nucléaire ; ces structures sont à l'origine de microtubules situés dans le hyaloplasme et dans le noyau lui-même. En revanche, les Algues présentent une grande diversité de systèmes, allant des centrioles classiques (Phéophycées) à des dispositifs composites moins organisés, en forme de globules et de plaques amorphes (Diatomées).

Selon la nature du centre organisateur, on peut obtenir des fuseaux classiques de microtubules ou des faisceaux cylindriques serrés, localisés à l'intérieur du noyau ou bien le traversant de part en part, sans détruire l'enveloppe, à travers de longs tunnels (cas des Dinophycées). L'enveloppe nucléaire peut, soit persister tout du long de la mitose, soit disparaître localement sous forme de fenêtres au niveau des centres organisateurs, ou complètement comme chez les organismes supérieurs ; dans le premier cas on parle de **mitoses fermées** ou semi-fermées. Chez la plupart de ces organismes, le mouvement des chromosomes à l'anaphase n'est pas lié à la présence de kinétochores ; les chromosomes glissent simplement le long des microtubules, ou bien ils sont accrochés à l'enveloppe nucléaire et se séparent sous l'action de son allongement, à la manière de ce qui est décrit chez les Bactéries (cas des Dinophycées). Il faut enfin signaler que la cytodiérèse chez de nombreuses Algues ou les Champignons n'a rien de comparable avec le système du phragmoplaste des Végétaux supérieurs.

La diversité des dispositifs observés est telle que ces lignes n'en donnent qu'une faible idée, chaque groupe présentant souvent des caractères uniques. Certains auteurs ont tenté de reconstituer un scénario évolutif linéaire, sur la base d'une complexification croissante de mécanismes faisant passer du système procaryotique simple à l'appareil mitotique des cellules animales, considéré comme le plus élaboré. De fait, cette diversité reflète surtout la divergence évolutive considérable existant entre tous les micro-organismes en général (polyphylétisme ; voir chapitre 15).

5. LES CARYOTYPES ET LEUR UTILISATION

5.1. Etablissement d'un caryotype ; cartographie des bandes des chromosomes

La réalisation des caryotypes est habituellement effectuée sur des tissus contenant des cellules en division active. Chez les Végétaux, on s'adresse aux méristèmes racinaires, faciles d'accès (pointes de racines en croissance rapide) ou aux cellules sexuelles mâles (dans les étamines, au sein desquelles les cellules mères des grains de pollen entrent en méiose). Chez les Animaux, on étudie souvent les spermatogonies ou les cellules sanguines en culture ; voir l'encart suivant.

ENCART TECHNIQUE

Réalisation d'un caryotype chez l'Homme

La difficulté pour se procurer aisément des cellules normalement en multiplication active, chez l'Homme, est tournée de la façon suivante :
1) un échantillon de sang est prélevé et mis en culture en présence de substances qui stimulent la multiplication des globules blancs (lymphoblastes), telles que les lectines ;
2) les cellules en division sont mises en présence de colchicine, drogue qui bloque les cellules en métaphase (voir chapitre 11) et favorise l'étalement des chromosomes ;
3) un choc osmotique est réalisé, qui fait éclater les cellules et libère les chromosomes (sur une plaque de verre) ;
4) après fixation et coloration, la préparation cytologique est observée au microscope, à fort grossissement, photographiée et analysée (voir *figure* 12.16). Cette dernière étape est actuellement le plus souvent remplacée par une analyse directe d'image sur écran, grâce à des systèmes de traitement électronique des images.

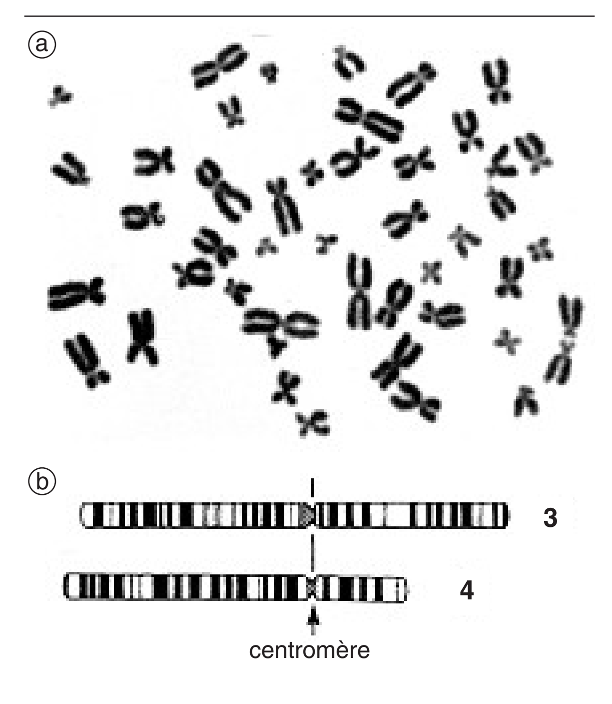


Figure 12.16

Les chromosomes humains

(a) Observation brute des 46 chromosomes après un *squash*. Lorsqu'on représente un caryotype, on ne dessine que le stock haploïde de base caractéristique de l'organisme (et éventuellement le chromosome sexuel) ; cette représentation est appelée idiogramme. **(b)** Résultat de la technique de *banding* G appliquée aux chromosomes humains : exemples des chromosomes 3 et 4.

Les éléments de base de la caractérisation des chromosomes ont longtemps été seulement la taille et la position du centromère. L'indice centromérique, défini plus haut, permet de différencier des catégories morphologiques simples telles que : chromosomes métacentriques, acrocentriques ou télocentriques, selon que le centromère est médian, subterminal ou terminal. Depuis les années 70, plusieurs techniques cytologiques (dites de ***banding***) ont été développées, qui permettent de compléter cette description en mettant en évidence un profil reproductible de bandes transversales colorées, le long des chromosomes. Il est ainsi possible d'identifier chacun d'eux sans ambiguïté, même lorsque la taille ou l'indice centromérique sont peu discriminants. La première technique (qui utilise la coloration de Giemsa, classique en cytologie) met préalablement en œuvre une protéolyse partielle des chromosomes ; elle fait apparaître des bandes sombres, dites **bandes G** (voir *figure* 12.16). Le même profil de bandes est également visualisé grâce à un colorant fluorescent (la quinacrine) qui se fixe préférentiellement sur les régions riches en paires de bases A-T **(bandes Q)** ; les centromères sont généralement bien colorés par cette technique, mais pas les télomères. Un autre colorant fluorescent (l'acridine orange) a une plus grande affinité pour les paires de bases G-C et donne un marquage complémentaire du précédent : on parle de **bandes R** (pour *reverse*) ; celui-ci permet donc de bien voir les zones télomériques, ce qui est important dans le cas de la détection d'échanges anormaux d'extrémités de bras de chromosomes (translocations).

Chez l'Homme, plus de 2000 bandes sont ainsi répertoriées, ce qui autorise une analyse très fine dont nous verrons plus loin les intérêts multiples. Il faut cependant bien comprendre que chaque bande visible, aussi fine soit-elle, correspond à un grand nombre de gènes ; la signification exacte de ces bandes plus ou moins riches en A-T et G-C reste mal comprise. On doit enfin signaler que lorsqu'on peut analyser les chromosomes à des stades un peu plus précoces que la métaphase (en fin de prophase, alors qu'ils sont moins condensés) on arrive à compter jusqu'à trois fois plus de bandes. En fait, celles-ci fusionnent progressivement à mesure que la spiralisation s'avance dans le temps, pour donner des bandes plus grosses et moins bien délimitées.

5.2. Intérêt de l'établissement des caryotypes

Outre l'étude de la structure du stock chromosomique et de ses variations au cours des deux phases de vie caractéristiques des cycles de reproduction sexuée, la réalisation des caryotypes présente un double intérêt, à la fois appliqué et fondamental.

5.2.1. Intéret en pathologie : les anomalies chromosomiques

De nombreuses anomalies morphologiques et physiologiques, en particulier dans le monde animal, sont associées à des modifications des chromosomes décelables par l'analyse des caryotypes ; il existe deux grands types de remaniements, concernant la structure ou le nombre des chromosomes. Leur taille, leur forme et leur organisation interne peuvent être affectées par divers événements, tels que : inversion, délétion ou addition, duplication, translocation de segments de chromosomes, fission ou fusion de chromosomes entiers au niveau des centromères. Le nombre de chromosomes peut être modifié de deux façons différentes, soit au niveau global, soit au niveau de chacun d'eux. Dans le premier cas, on a des phénomènes de **polyploïdie** dans les cellules somatiques qui, au lieu de contenir 2n chromosomes (diploïdie), en renferment 3n (triploïdie), 4n (tétraploïdie)... Inversement, et de façon exceptionnelle, certains organismes supérieurs sont constitués de cellules haploïdes, au lieu de cellules diploïdes (cas des faux-bourdons).

La méiose étant un processus complexe, il n'est pas rare que des erreurs se produisent, en particulier des phénomènes de non séparation (non disjonction) des homologues en division I, situation la plus fréquente, ou des chromatides en division II. Dans ces deux cas, les gamètes formés héritent d'un nombre anormal de chromosomes, soit en trop, soit en moins. Les zygotes obtenus après une fécondation mettant en jeu ces gamètes anormaux présenteront donc un caryotype dit **aneuploïde** : pour une paire donnée de chromosomes homologues dans une cellule normalement diploïde, on a une unité en trop (trisomie : 2n +1 chromosomes) ou en moins (monosomie : 2n -1 chromosomes) ; l'anomalie peut aussi bien affecter les autosomes que les chromosomes sexuels ; voir l'encart biomédical suivant. Les Végétaux s'accomodent bien de la présence d'anomalies chromosomiques qui induisent des désordres sévères chez les Animaux : le degré supérieur d'intégration des fonctions physiologiques chez ces derniers est certainement responsable de cet état de choses.

Encart biomédical

Les anomalies chromosomiques chez l'Homme

Diverses anomalies chromosomiques responsables de syndromes plus ou moins graves sont connues chez l'Homme. L'exemple le plus classique est celui du syndrome de Down, ou mongolisme (trisomie 21). Il existe un rapport clair entre l'âge de la mère et la probabilité qu'elle ait un enfant trisomique. Le processus de non disjonction est mis en rapport avec le vieillissement des cellules germinales au sein des ovaires. À l'exception des trisomies des chromosomes 13, 18 et 21, ces anomalies sont létales au cours du développement embryonnaire ou fœtal, de même que toutes les monosomies. Plus de 50 % des avortements spontanés seraient dus à des anomalies de ce type.

L'aneuploïdie concerne aussi les chromosomes sexuels. Elle est en général moins désastreuse pour le développement que les précédentes, mais un mauvais dosage des chromosomes X ou Y perturbe la physiologie sexuelle des individus. Le syndrome de Turner (un seul X, ou XO) correspond à un individu femelle dont le développement génital s'arrête à un stade juvénile. Les individus de type XXY sont des hommes stériles présentant des caractères féminins et un retard mental (syndrome de Klinefelter), tandis que ceux de type XYY sont d'apparence normale.

D'autres anomalies correspondent à des altérations de la structure même des chromosomes. Les phénomènes d'inversion ne sont pas responsables d'anomalies phénotypiques chez les individus, mais ils sont à l'origine de la formation de chromosomes anormaux lors de la méiose. De même, les translocations peuvent ne pas avoir de répercussions, mais certaines d'entre elles augmentent la probabilité d'obtenir des cellules cancéreuses. C'est le cas des formes de leucémie liées à la présence du chromosome dit «de Philadelphie», qui est une version raccourcie du chromosome 22, avec une translocation sur le chromosome 9. La synthèse

d'une protéine anormale intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire est activée, et une prolifération anarchique des cellules s'en suit. La perte d'un segment chromosomique, est presque toujours létale ou responsable d'anomalies graves (exemple du syndrome du « cri du chat » : délétion dans le chromosome 5).

L'établissement du caryotype, dans des situations à risques, fait donc partie des méthodes courantes de prévention ; le perfectionnement constant des techniques de cytologie a ainsi grandement bénéficié à la recherche médicale concernée par les maladies génétiques. Il faut à ce sujet signaler une application récente des caryotypes, à savoir la possibilité de cartographier des gènes sur les chromosomes par **hybridation *in situ*** avec des sondes correspondant à des séquences connues (voir chapitre 3) ; cette technique est très importante pour l'approche moléculaire de ces maladies et leurs thérapies.

5.2.2. Intéret dans l'étude de l'évolution

L'examen attentif des chromosomes apporte de nombreuses informations concernant les phénomènes de spéciation (origine des espèces) et d'évolution. On observe en effet que des espèces proches au plan systématique ont en général des caryotypes voisins ; les variations détectées à leur niveau permettent d'estimer la parenté entre espèces ou groupes animaux et végétaux, de construire des arbres généalogiques et de reconstituer des lignées évolutives. L'exemple des Primates peut illustrer l'utilisation des caryotypes pour l'étude de l'origine de l'Homme.

L'Homme (2n = 46) et le chimpanzé (2n = 48) sont deux genres séparés qui ne peuvent cependant être distingués, au niveau de leurs chromosomes, que par des différences mineures. Treize de leurs chromosomes sont strictement identiques, les autres sont similaires à quelques détails près (inversions et additions). La seule différence nette porte sur le chromosome 2 humain, qui résulte visiblement de la fusion de 2 chromosomes bien identifiables chez le chimpanzé. Lorsqu'on analyse les caryotypes des divers représentants de Primates (singes, ou Simiens, et Humains), on observe à la fois des ressemblances et des différences dans leurs chromosomes. En comparant avec soin leurs profils de bandes, on identifie des chromosomes ou des segments de chromosomes homologues dans ces différentes espèces, ce qui permet de construire des arbres généalogiques pour chacun d'eux.

Par exemple, dans le cas du chromosome 7 (métacentrique) de l'Homme, on montre que celui-ci se retrouve chez les Prosimiens (ancêtres très lointains, représentés par les Lémuriens de Madagascar) sous la forme de deux chromosomes acrocentriques distincts. Ces deux entités différentes existent aussi chez les singes d'Amérique tandis que ceux d'Afrique et l'Homme n'ont qu'un seul chromosome, qui provient donc très clairement de la fusion, au niveau des centromères, des deux unités ancestrales. L'analyse détaillée d'autres remaniements tels que les fissions, les inversions, les translocations, qui affectent un grand nombre d'autres chromosomes, permet de situer les espèces, les genres, les familles, les uns par rapport aux autres et donc de retracer l'histoire du groupe au cours du temps. Cette étude confirme que le gorille, le chimpanzé et l'Homme représentent une branche récemment individualisée dans l'évolution des Primates.

Les relations de parenté entre espèces de drosophiles ont pu, la même façon, être clairement établies grâce à l'examen de leurs chromosomes ; l'analyse du caryotype de ces organismes est grandement facilitée par la présence, au sein des tissus larvaires, de chromosomes géants polyténiques dont les profils de bandes colorées sont bien caractéristiques (voir chapitre 8). Chez les Végétaux supérieurs, il existe aussi de nombreux exemples d'espèces naturelles ou domestiquées (créées par l'homme) dans les caryotypes desquelles on reconnaît cytologiquement la participation de génomes entiers issus des espèces parentales (phénomènes d'auto- et d'allopolyploïdie).

Il faut cependant signaler l'existence d'exceptions à cette règle de parenté caryotypique entre espèces voisines. Chez les Animaux, par exemple, on connaît deux espèces très voisines de cerfs (semblables par l'aspect et le comportement, mais non fertiles entre-elles) dont les caryotypes sont complètement différents : 4 grands chromosomes dans un cas, et 23 petits dans l'autre. Des situations identiques sont décrites dans le monde végétal ; c'est le cas de la fève et du haricot, qui ont des quantités d'ADN par noyau et des nombres chromosomiques bien différents.

Les maladies de la réparation de l'ADN

Chez tous les êtres vivants, la complexité des mécanismes mis en œuvre dans les processus de réparation de l'ADN endommagé a été démontrée ; l'inactivation de chacun des gènes codant pour les enzymes impliquées dans ces systèmes a pour conséquence immédiate une diminution importante de la capacité des cellules à réparer leur ADN, et une augmentation du taux de mutation. Chez l'Homme, l'existence de nombreuses maladies génétiques se traduisant par une prédisposition à divers cancers et, très souvent, par une hypersensibilité à des agents physiques (rayons UV ou gamma), atteste de l'importance vitale de ces processus. Parmi les nombreuses maladies de ce genre actuellement identifiées, deux retiendront notre attention.

• Le syndrome nommé *Xeroderma pigmentosum* est une maladie récessive autosomale affectant en moyenne un individu sur 250 000. Les patients présentent un phénotype caractéristique : une extrême sensibilité aux rayons UV, de sorte qu'ils développent de multiples cancers de la peau sur toutes les zones exposées à la lumière solaire ; une peau sèche vieillissant prématurément ; une photophobie s'accompagnant de cataracte et un risque élevé de tumeurs oculaires. De plus, des signes neurologiques graves : retard mental et dégénérescences neurologiques, s'ajoutent souvent à ces traits (25 % des malades) ; l'espérance de vie est peu élevée : moins des deux tiers des individus atteignent l'âge adulte. Il n'y a pas de traitement, sauf la protection contre la lumière.

Il a été montré, en 1968, que ces individus ne disposent plus de mécanisme efficace d'élimination des dimères de thymine causés par les UV ; il s'agit du système décrit plus haut sous le nom de «système de réparation par excision d'oligonucléotides». Huit gènes peuvent être touchés, correspondant aux diverses protéines impliquées dans cette réparation. Des formes homologues de tous ces gènes ont été retrouvées chez la levure de bière ; le système équivalent chez *E. coli* ne nécessite que trois protéines, et l'oligonucléotide excisé y est aussi plus court (13 bases, contre 29 chez l'Homme).

Il faut rappeler ici que tous les individus, même ceux chez qui le système de réparation fonctionne parfaitement, doivent se méfier des expositions prolongées au soleil. Au-delà de certaines limites, les cellules sont incapables de corriger toutes les lésions de l'ADN. La conséquence, ici aussi, est l'apparition de mutations et la survenue de cancers de la peau.

• Le cancer du colon et du rectum est une forme très répandue de tumeur maligne (10 % du total). Si, dans la plupart des cas, il ne s'agit pas d'une maladie génétiquement transmissible, on connaît cependant au moins une forme de prédisposition héréditaire à cette affection (15 % des cancers du colon). Les individus à risque ont une probabilité de développer la maladie très supérieure à la moyenne de la population. En 1993, il a été montré que la quasi-totalité de ces malades possède une forme altérée de l'un des nombreux gènes codant pour les protéines intervenant dans la «réparation des mésappariements de bases» (erreurs effectuées lors de la réplication). Les défauts dans ces gènes induisent l'apparition de mutations dans d'autres gènes, favorisant la survenue de cellules cancéreuses.

Les familles à risque font actuellement l'objet d'une surveillance accrue, et l'identification des gènes mutés autorise la réalisation de diagnostics génétiques prénataux. D'un point de vue préventif, la pratique régulière de coloscopies chez les individus atteints permet l'élimination chirurgicale des polypes, avant que ceux-ci ne donnent des tumeurs malignes.

La situation est identique pour une forme de prédisposition au cancer du sein et des ovaires, chez la femme ; on sait maintenant que les personnes affectées sont incapables de réparer les cassures d'ADN double-brin, au moyen du système de correction nommé plus haut «réparation homologue».

RÉSUMÉ

Chez les êtres unicellulaires, la division est le seul moyen de reproduction et de colonisation des milieux. En revanche, chez les pluricellulaires, elle intervient de diverses manières, lors de la construction de l'organisme (développement embryonnaire des Animaux et des Végétaux), ou pendant la vie de l'adulte, à travers la réparation des tissus, la régénération et la production des gamètes, par exemple.

La mitose est un mode de reproduction conforme de l'information génétique chez les Eucaryotes ; elle peut s'effectuer dans des cellules de ploïdie quelconque. En revanche, la méiose, qui intervient dans les processus de reproduction sexuée, implique deux divisions successives ; elle permet le passage d'une cellule diploïde (2n chromosomes) à quatre cellules haploïdes (n chromosomes). Ses conséquences sont considérables au plan génétique, car elle est une source majeure de recombinaison, via les mécanismes dits de brassage inter et intra-chromosomique.

La transmission fidèle du message héréditaire lors de la division repose sur la duplication de l'ADN, qui est un processus semi-conservatif catalysé par des ADN polymérases. Le fonctionnement de ces enzymes dans un seul sens (5′ → 3′) implique un mode de synthèse complexe des nouveaux brins d'ADN et l'intervention d'un grand nombre d'enzymes. Au niveau des yeux de réplication, la synthèse des deux nouveaux brins d'une même fourche s'effectue de manière très différente : le brin précoce est allongé de façon continue à partir de l'origine de réplication, tandis que le brin retardé nécessite la synthèse récurrente d'amorces d'ARN et de brins d'Okasaki qui seront ensuite ligaturés.

La duplication de l'unique chromosome circulaire bactérien démarre au niveau d'une seule origine et met en œuvre un seul œil de réplication à fonctionnement bidirectionnel. Chez les Eucaryotes, qui possèdent de longs chromosomes linéaires, il existe plusieurs dizaines de réplicons de taille différente sur chacun d'eux, dont la mise en route n'est pas simultanée. La mitose est le processus propre aux Eucaryotes par lequel le matériel génétique d'une cellule est transmis, après sa duplication, aux cellules-filles. C'est sous la forme de chromosomes condensés, mécaniquement appropriés pour être distribués sans erreur, que cette répartition est effectuée. La condensation de l'ADN dans ces structures résulte de la superposition de plusieurs niveaux d'organisation ; elle permet un degré de compaction d'environ 10^4 fois.

La mitose comprend cinq étapes au cours desquelles les chromosomes s'individualisent et se partagent entre les cellules-filles au moyen d'un système complexe appelé appareil mitotique. Chez les cellules animales, le centrosome est un centre organisateur d'où émergent trois sortes de microtubules : astériens, polaires et kinétochoriens. Les deux premières catégories de fibres permettent d'organiser l'espace cellulaire alors que les dernières assurent efficacement la séparation des deux lots de chromosomes-frères et leur rassemblement dans chaque cellule, après la cytodiérèse.

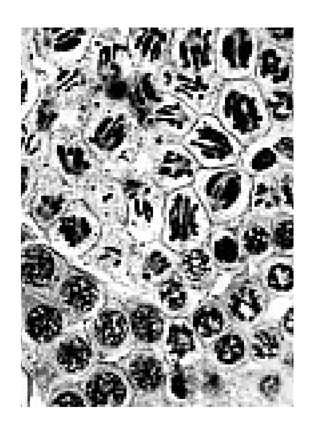
Il existe des différences importantes entre certains mécanismes de la division chez les Animaux et les Végétaux, en ce qui concerne l'origine des systèmes associés au mouvement des chromosomes, et le partage du cytoplasme. Bien que la mitose soit une division conforme, elle peut aboutir, à travers des phénomènes de division asymétrique du cytoplasme, à la formation de cellules ayant des destinées différentes ; on en connaît de nombreux exemples chez tous les pluricellulaires.

L'établissement des caryotypes, basé sur des caractères morphologiques ou biochimiques propres à chaque chromosome, conduit à des applications médicales importantes. Il est en effet possible d'associer certaines anomalies chromosomiques (souvent liées à des dysfonctionnements de la méiose), à des syndromes plus ou moins graves chez l'Homme. De plus, la comparaison des stocks chromosomiques d'espèces proches permet souvent d'établir entre elles des relations phylogénétiques, comme cela a été montré dans le cas des Primates et de la lignée humaine.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Rappeler les différents rôles des divisions cellulaires chez les organismes pluricellulaires.
2. Quelles différences fondamentales existe-t-il entre la mitose et la méiose, au plan cytologique et en ce qui concerne la signification biologique ?
3. Rappeler les mécanismes qui sont à l'origine du brassage inter-chromosomique et du brassage intra-chromosomique, lors de la méiose.
4. Quelles sont les 4 étapes théoriques de la réplication de l'ADN, telles qu'on peut les prédire à partir de la structure en double-brin de cette molécule.
5. Décrire l'expérience fondamentale ayant permis, chez les Bactéries, de démontrer que la réplication de l'ADN est de type semi-conservatif.
6. Quelles sont les caractéristiques majeures du fonctionnement de toutes les ADN polymérases ?
7. Décrire les éléments de structure et le principe de fonctionnement d'un œil de réplication.
8. Qu'appelle-t-on fragments d'Okasaki et comment interviennent-ils dans la progression d'une fourche de réplication ?
9. Comment peut-on démontrer, au moyen de l'autoradiographie, le caractère bidirectionnel du fonctionnement des yeux de réplication eucaryotiques, et mesurer la vitesse de ce processus ?
10. Donner la liste des protéines et des principales activités enzymatiques mises en jeu dans la synthèse des deux brins d'ADN lors de la réplication.
11. Décrire deux expériences ayant permis de comprendre la façon dont un chromosome bactérien se duplique.
12. Quelles sont les particularités qui distinguent la duplication des chromosomes eucaryotiques de celle des chromosomes bactériens ?
13. Pour quelles raisons moléculaires la réplication chez les Eucaryotes est-elle plus lente que chez les Procaryotes ?
14. Donner deux exemples de modifications chimiques spontanées ou provoquées de l'ADN, et décrire leurs conséquences au niveau des cellules et des organismes.
15. Énumérer les principaux modes de réparation de l'ADN mis en évidence chez les êtres vivants.
16. Nommer les éléments constitutifs caractéristiques des chromosomes métaphasiques des cellules eucaryotiques et décrire leur architecture moléculaire.
17. Rappeler les cinq stades de la mitose et décrire les événements majeurs qui les caractérisent.
18. Comment est constitué l'appareil mitotique des cellules animales, et comment fonctionne-t-il pour assurer le partage égal des chromosomes-frères lors de l'anaphase ?
19. Quel est le rôle des moteurs microtubulaires dans le mouvement des chromosomes lors de l'anaphase chez les Eucaryotes ?
20. Quelles sont les particularités de la mitose des cellules des Végétaux supérieurs ? En quoi la cytodiérèse de ces cellules diffère-t-elle de celle observée chez les Animaux ?
21. Donner la définition des techniques de *banding* et présenter deux exemples de l'utilisation des caryotypes.
22. Décrire trois maladies génétiques liées à un dysfonctionnement de la méiose chez l'espèce humaine.



Chapitre 13

CONTRÔLE DU CYCLE CELLULAIRE CHEZ LES EUCARYOTES

Un exemple de signalisation cellulaire : le déclenchement de la mitose

La vie des cellules est ponctuée de phases de croissance séparées par des phases de divisions, ce qui définit un cycle, bien que ce ne soit pas la même cellule qui en traverse les différents stades. Une très grande diversité est observée en ce qui concerne la durée du cycle cellulaire. C'est chez les êtres unicellulaires, en général, que la prolifération cellulaire est la plus spectaculaire : le temps de génération des cellules procaryotiques est souvent inférieur à 30 minutes, et chez la levure, Eucaryote inférieur, il est voisin de 2 h. Les cellules des organismes pluricellulaires complexes se reproduisent à des vitesses très différentes selon les tissus et, dans certains cas, elles ne se divisent plus du tout chez l'adulte.

Chez les Bactéries, la synthèse de l'ADN et la duplication du chromosome sont continues tout au long de la période de croissance, et le doublement de taille de la cellule est atteint au moment où le chromosome est dupliqué ; le cycle est ici très simple, avec deux phases seulement qui s'enchaînent : duplication et répartition du matériel génétique dans les cellules filles. L'organisation des cellules eucaryotiques est plus complexe, et leur cycle cellulaire comprend toujours deux périodes distinctes, identifiables en fonction de l'état du noyau, comme nous l'avons vu dans le chapitre 12. De plus, les mécanismes contrôlant les étapes du cycle y sont beaucoup plus élaborés que chez les Procaryotes.

Toutes les cellules reçoivent des informations en provenance de leur environnement et communiquent avec leurs congénères ou les cellules voisines. Ces signaux (chimiques ou physiques) induisent le plus souvent chez les cellules des réponses à des changements des conditions de milieu : les bactéries, par exemple, orientent leurs déplacements en fonction de la quantité et de la nature des nutriments présents dans leur milieu, et les levures sont sensibles aux phéromones émises par leurs partenaires sexuels. Ce qui est vrai pour les unicellulaires libres l'est également pour les cellules des êtres multicellulaires. La pluricellularité, caractéristique des Eucaryotes, a nécessité la mise en place de contrôles stricts des divisions des divers types de cellules appartenant à ces organismes, de manière à maîtriser la taille des organes qui les constituent. De même, des réseaux complexes de communication intercellulaire ont été établis, permettant le fonctionnement intégré de l'organisme entier.

Pendant près de 3 milliards d'années, seuls des êtres unicellulaires ont peuplé la Terre ; la pluricellularité est une acquisition récente dans l'histoire du vivant (– 700 millions d'années ; voir chapitre 16). C'est sans doute en raison de la complexité de ces réseaux que l'évolution a été aussi lente pour passer des unicellulaires aux multicellulaires. L'ensemble des réactions permettant aux cellules de percevoir les stimuli extérieurs et d'y répondre, constitue le « métabolisme de l'information » ; la moitié des 25 plus grandes familles de protéines identifiées chez les Mammifères sont consacrées à celui-ci. L'élucidation des mécanismes de signali-

sation cellulaire constitue un des volets majeurs de la Biologie actuelle ; si de nombreuses connaissances ont été acquises grâce à l'étude de dérèglements cellulaires tels que les cancers, la lutte contre ces derniers bénéficie en retour de ces recherches fondamentales. Quelques notions de signalisation ont déjà été évoquées dans les chapitres 5 et 7 ; elles seront complétées dans ce chapitre par l'étude de la stimulation de la division cellulaire par un facteur de croissance : l'EGF.

1. LE CYCLE CELLULAIRE ET SES MÉTHODES D'ANALYSE CHEZ LES EUCARYOTES

La notion de cycle cellulaire s'applique en toute rigueur aux seules cellules qui se divisent régulièrement ; c'est par exemple le cas des Protistes, des cellules de levure, des cellules embryonnaires ou des cellules en culture. Ces dernières constituent un matériel d'étude privilégié, en raison de leur homogénéité et de leur rapidité de croissance : leur cycle est compris entre 12 et 36 heures (voir chapitre 3). En revanche, la notion de cycle est inappropriée dans le cas des cellules qui se divisent très rarement, voire pas du tout, comme c'est la règle dans la plupart des tissus des organismes pluricellulaires complexes ; les cellules hépatiques, par exemple, se divisent seulement tous les six à douze mois. Nous verrons dans le chapitre 14 pourquoi une différenciation poussée est incompatible avec une division régulière.

1.1. Identification des phases du cycle cellulaire et mesure de leur durée

Au cours de l'interphase, qui est en général la période la plus longue du cycle, la masse du cytoplasme des cellules en prolifération s'accroît de façon régulière et continue, jusqu'à ce que le nombre ou le volume de l'ensemble de ses constituants aient doublé. Pendant longtemps, cette période d'intense activité métabolique n'a pu être subdivisée en phases distinctes ; l'absence de repères ne facilitait donc pas l'analyse des processus se déroulant en interphase. On a cependant montré que sur ce fond de croissance continue ont lieu des événements brusques, tels que la réplication de l'ADN, la synthèse des histones ou celle des ADN polymérases. Ces phénomènes sont relativement faciles à mettre en évidence car d'ampleur importante, mais ils ne sont que la conséquence de processus beaucoup plus discrets impliquant des composés peu abondants (molécules régulatrices).

1.1.1. Mise en évidence de différentes phases au cours du cycle cellulaire

Le premier constituant chimique manifestant une évolution discontinue pendant cette période fut identifié comme étant l'ADN : sa synthèse se déroule en pleine interphase, pendant une **phase** appelée **S** (pour synthèse) au cours de laquelle sa masse est exactement doublée. Cet événement permet de définir deux autres périodes : les **phases G1** (après la division, avant S) **et G2** (après S, et avant la division suivante). Les quantités d'ADN dites 2 c et 4 c caractérisent ces deux périodes dans les cellules diploïdes ; les lettres G et c sont les initiales de *gap* (intervalle), et *complement* (quantité d'ADN caractéristique du génome de l'espèce). Le cycle cellulaire comporte donc une succession de quatre périodes : G1, S, G2 et M (M pour mitose ; voir *figure* 13.1). Nous avons vu plus haut qu'une autre série d'événements est décrite au niveau cytologique, beaucoup plus discrète que celle affectant le noyau, et de découverte plus récente : il s'agit du cycle centrosomique, qui se déroule dans le cytoplasme des cellules animales.

La première approche expérimentale du cycle cellulaire consiste à mesurer la durée de ses phases ; diverses techniques permettent ceci, aussi bien sur des populations de **cellules synchrones** (toutes les cellules sont au même stade à un moment donné) que sur des populations de **cellules non synchrones** (toutes les cellules sont, de manière complètement aléatoire, à une phase quelconque du cycle).

1.1.2. Réalisation de cultures synchrones et mesure de la durée des phases du cycle

La connaissance de la durée du cycle complet est un préalable indispensable à ce type d'étude. Sa mesure dans une population de cellules proliférantes, synchrones ou non, est très simple : il suffit de dénombrer les cellules dans des échantillons prélevés au cours du temps. Le temps de double-

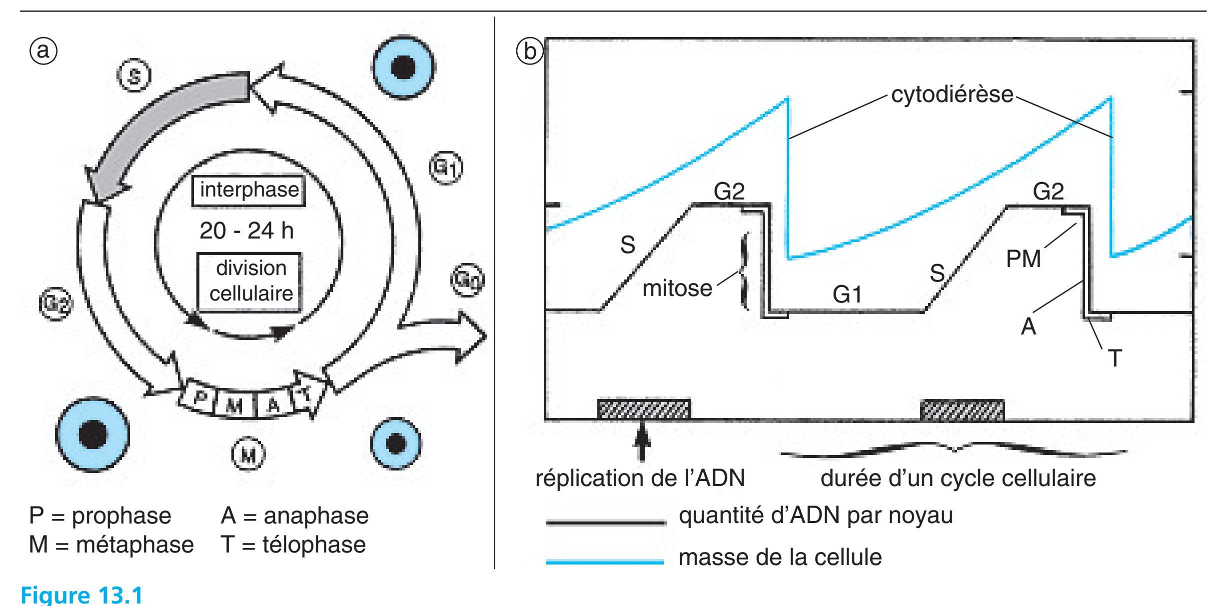


Figure 13.1

Le cycle cellulaire standard des cellules eucaryotiques

(a) Succession des phases G1, S, G2 et M et engagement éventuel dans la phase d'arrêt G0. **(b)** Graphe traduisant l'évolution de l'ADN et de la masse du cytoplasme au cours du cycle.

ment de l'effectif correspond au temps de génération, la population s'accroissant de façon exponentielle (en marches d'escalier, si celle-ci est synchrone, ou régulièrement, si elle ne l'est pas).

Plusieurs méthodes permettent d'obtenir des populations synchrones. Tout d'abord, comme les cellules augmentent de taille au cours du cycle, on peut imaginer les séparer grâce à des techniques de filtration ou de centrifugation : les plus petites d'entre elles viennent en effet de se diviser tandis que les plus grosses vont entrer en division. Cette méthode rudimentaire reste d'une efficacité limitée. Dans le cas des cellules animales en culture, on exploite le fait que celles qui entrent en division s'arrondissent et tendent à se détacher de leur support, à la suite de la modification de leur cytosquelette ; elles sont facilement séparables de celles qui restent adhérentes au substrat par simple agitation des boîtes, et récupérables par décantation. La méthode décrite sous le nom de **cytométrie en flux** est également utilisable sur des suspensions cellulaires ; en effet, associée à un **trieur de cellules**, elle permet d'obtenir des populations considérables de cellules viables relativement synchrones (voir chapitre 3).

La technique la plus élégante, mais applicable à un nombre limité de systèmes biologiques, est l'utilisation de **mutants conditionnels** du cycle (voir chapitre 3). Dans certaines conditions de température, dites restrictives, ces souches thermosensibles arrêtent leur développement à une phase précise du cycle et toutes les cellules se synchronisent les unes après les autres au même stade. Si on les remet dans des conditions où la mutation ne s'exprime pas, toutes les cellules redémarrent évidemment en même temps, et du même point ; cette méthode a été particulièrement développée chez la levure, dont la génétique est aisée (voir plus loin).

La durée des phases G1, S et G2 est aisément mesurable dans ces populations, après prélèvement d'échantillons tout au long du cycle et dosage de la quantité d'ADN par cellule. Ce dernier est fait après extraction chimique, ou directement au niveau de chaque noyau cellulaire : on peut, en effet, colorer l'ADN, sur coupes ou écrasements, grâce à une méthode quantitative de type Feulgen (voir chapitre 8) et le doser par une technique alliant la cytologie et la spectrophotométrie : la **cytophotométrie**. Une dernière approche, plus complexe à mettre en œuvre, est réalisable : des échantillons de cellules sont incubés dans de la thymidine ^{3}H pendant un temps bref (*pulse*), fixés immédiatement, puis traités pour l'autoradiographie. Seules les cellules en phase S (incorporant la thymidine radioactive dans leur ADN) fourniront une image autoradiographique positive, c'est-à-dire présentant des grains d'argent au niveau du

noyau interphasique. En balayant toute la durée du cycle avec cette méthode, on peut déterminer la durée des trois phases citées plus haut.

La difficulté avec les populations synchrones est que le synchronisme dure peu de temps : après deux ou trois cycles, une fraction déjà non négligeable des cellules est nettement déphasée. La raison de ceci est simple à comprendre : la taille étant un signal important pour déterminer le moment de la division, il suffit que les mitoses donnent des cellules dont la masse est légèrement différente pour induire un décalage. Une petite cellule mettra plus de temps à atteindre la taille critique qu'une cellule légèrement plus grosse au départ, ces effets étant cumulatifs à chaque génération.

1.1.3. Mesure de la durée des phases dans le cas de cellules non synchrones

Dans les conditions d'une culture non synchrone, le pourcentage de cellules se trouvant dans une phase donnée du cycle représente le pourcentage du temps que dure cette phase par rapport à la durée du cycle complet. Par exemple, si à un moment donné on observe statistiquement 10 % des cellules totales en mitose, cela signifie que la durée de celle-ci représente 10 % du cycle cellulaire. Sur la base de ce principe, on détermine facilement la longueur des phases M et S, qui sont bien caractérisées au plan cytologique et physiologique : le pourcentage des cellules en mitose à tout instant est en effet directement mesurable au microscope, tandis que celui des cellules qui incorporent de la thymidine ^{3}H est estimé à la suite d'une expérience de *pulse* simple suivi d'autoradiographie (voir *figure* 13.2). De la même façon, la durée des différentes phases de la mitose peut être directement calculée sur des populations non synchrones, au moyen de la seule analyse cytologique.

L'estimation des durées des phases G1 et G2 est plus difficile, car il n'existe pas de marqueur cytologique ou physiologique qui les caractérise, en dehors de la quantité d'ADN. L'utilisation de la cytophotométrie ou de la cytométrie en flux permet de régler la question dans certaines situations favorables : les cellules dont l'ADN est mesuré à 2 c sont en G1, celles à 4 c sont en G2 et celles dont la valeur est intermédiaire sont en phase S. Les résultats sont traduits sous forme d'histogrammes décrivant l'état de la population par rapport à ces trois phases (voir *figure* 13.3a).

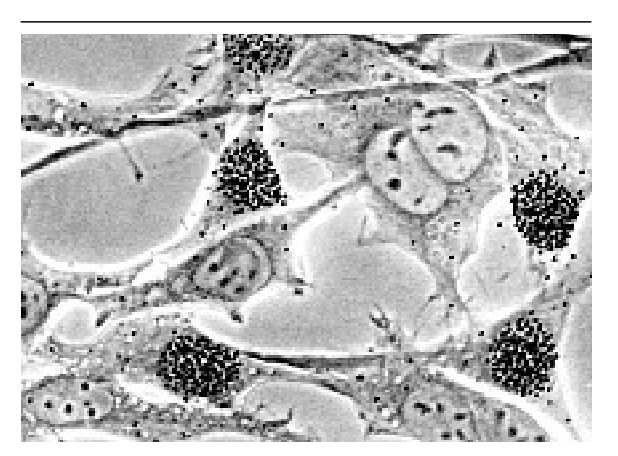


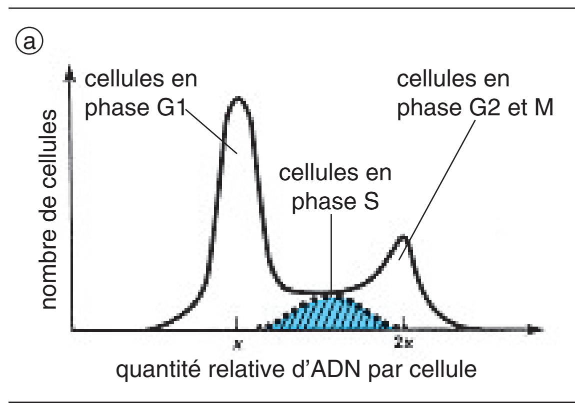
Figure 13.2

Durée de la phase S du cycle cellulaire

Détermination de la durée de la phase S dans une population non synchrone de cellules animales en culture, par marquage à la thymidine ^{3}H suivi d'une autoradiographie ; le cliché montre des noyaux interphasiques marqués (dont l'ADN est radioactif) et non marqués.

L'utilisation de précurseurs radioactifs permet de calculer la durée des phases S + G2, grâce à l'expérience suivante : après un *pulse* de radioactivité et un rinçage dans un milieu normal, des échantillons de cellules sont régulièrement prélevés au cours d'une chasse, puis fixés et traités pour l'autoradiographie. Au bout d'un certain temps de chasse, on commence à noter la présence de figures de mitoses marquées ; on en observe encore pendant quelque temps, puis ensuite elles disparaissent (on voit toujours des mitoses, ce qui est normal, mais les chromosomes ne sont plus radioactifs). Les premières mitoses marquées correspondent aux cellules qui étaient en phase S au moment du *pulse*, et qui étaient les plus avancées dans cette phase (phase S tardive) ; elles n'ont donc eu à parcourir que la fin de S et la phase G2 avant d'être vues en mitose. Le temps mesuré est, en première approximation, celui correspondant à G2 seul. On note aussi que le temps pendant lequel on observe des mitoses marquées représente la durée de la phase S : les dernières mitoses marquées sont dues aux cellules entrées en phase de réplication au cours du pulse ; celles-ci ont dû parcourir tout S + G2 pour pouvoir être vues par autoradiographie. Ce type d'expériences permet donc de mesurer G2, S et par déduction G1 (si on connaît la durée totale du cycle et de M) ; quelques exemples de valeurs sont donnés dans la *figure* 13.3b.

Il ressort de ces analyses que la durée de la mitose est relativement brève par rapport au cycle



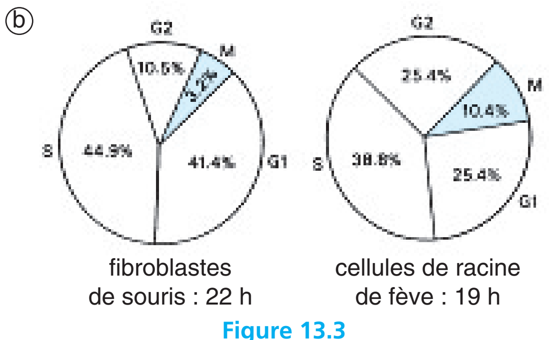


Figure 13.3

Durée des phases du cycle cellulaire

(a) Histogramme obtenu grâce à la cytométrie en flux : la surface des pics est proportionnelle au pourcentage de chaque type de cellules. **(b)** Diagrammes illustrant la durée des différentes phases dans des cellules animales et végétales en prolifération.

total (environ 5-10 %), et que la phase la plus variable est la phase G1. En revanche, la durée de S + G2 + M est relativement constante pour un organisme donné. Dans le cas des cellules qui n'entrent plus en division et s'engagent dans un processus de différenciation souvent irréversible, on distingue parfois une **phase G0**, qui correspond à la phase G1 des cellules en prolifération. Certaines cellules en G0 peuvent cependant se remettre à se diviser si elles reçoivent des signaux stimulateurs, en général sous la forme de facteurs de croissance (voir plus loin).

1.1.4. Exceptions au schéma classique du cycle

Les cellules embryonnaires de divers Animaux présentent des particularités remarquables en ce qui concerne leur cycle cellulaire. Tout au début du développement des Amphibiens, pendant la phase de segmentation, les cellules se divisent toutes les 30 min, c'est-à-dire aussi rapidement qu'une cellule bactérienne dans les conditions optimales de croissance. Cette durée est 40 fois plus courte que celle mesurée dans des cellules en culture des mêmes organismes. Le raccourcissement extrême du cycle est dû à deux raisons : 1) les cycles se succèdent sans phases G1 et G2, car il sont réduits à leur strict minimum : les phases S et M ; 2) les phases de synthèse de l'ADN sont très raccourcies grâce à l'utilisation de nombreuses origines de réplication surnuméraires faisant l'objet d'un contrôle spécifique du développement embryonnaire. Il faut remarquer que ces divisions conduisent simplement au partage d'un cytoplasme préexistant et donnent des cellules dont la taille est divisée par 2 à chaque cycle ; un rythme normal de division s'installe lorsque le rapport nucléocytoplasmique habituel est restauré. Dans les embryons de drosophile, les premiers noyaux obtenus se divisent toutes les 8 min, mais sans partage cytoplasmique. Tous les clichés spectaculaires d'yeux de réplication multiples ont été obtenus sur ce matériel où, de plus, les cellules se divisent de façon synchrone, ce qui est une situation très favorable pour ces observations.

1.2. Contrôle du déroulement du cycle

Si on l'envisage sous l'angle du seul matériel génétique, le cycle cellulaire comprend deux phases principales : la duplication de l'ADN et sa répartition égale dans les deux cellules-filles ; elles sont séparées par deux points cruciaux : la transition G1 → S (mise en route de la synthèse de l'ADN) et la transition G2 → M (déclenchement de la mitose). Pour accomplir ce cycle, les cellules doivent mettre en œuvre tout un ensemble de processus coordonnés les uns avec les autres, d'une grande complexité et dont la compréhension est récente. Les données de la biologie moléculaire montrent que les systèmes de contrôle sont universels chez les Eucaryotes, depuis la levure jusqu'à l'Homme, malgré la diversité des modalités de la mitose et de la cytodiérèse que nous avons décrites plus haut.

Le cycle cellulaire consiste en une séquence ordonnée d'événements tels que la cellule ne s'engage dans une nouvelle phase que si la précédente a été complètement réalisée, et que si celle-ci peut elle-même être accomplie dans des conditions favorables ; par exemple, la séparation des chromatides n'a lieu que si la réplication est terminée et si l'appareil mitotique est correctement mis en place. Ce fonctionnement implique des mécanismes précis de surveillance qui bloquent éven-

tuellement le déroulement du cycle au niveau de «points critiques» situés en particulier juste avant les deux transitions mentionnées plus haut. Dès qu'un point de restriction est franchi, le programme interne se déroule sans interruption jusqu'au suivant. Le système de contrôle du cycle est basé sur un dispositif biochimique complexe mettant en jeu deux protéines clefs et une multitude de protéines régulatrices. Nous verrons comment les décisions sont prises par la cellule, quelle est la nature des signaux qu'elle reçoit de l'extérieur ou qu'elle perçoit de l'intérieur, et comment elle contrôle sa prolifération.

1.2.1. Données de la biologie cellulaire et de la biochimie

Pendant longtemps, les approches biochimiques directes ont été inopérantes car même les techniques d'électrophorèse les plus puissantes ne permettent pas de voir de différences significatives entre les collections de protéines de cellules en phase G1 ou en phase S, par exemple. Seuls des tests biologiques ont permis de mettre en évidence, puis d'identifier, des facteurs de régulation présents à certaines phases du cycle et ayant des rôles bien précis dans son contrôle ; deux types d'expériences classiques doivent être décrites à ce sujet.

- **Expériences de fusions cellulaires**

Nous avons vu, dans le chapitre 3, qu'il est possible de faire fusionner des cellules animales entre-elles ; la mise en commun des cytoplasmes de cellules qui sont à des stades variés du cycle cellulaire est en effet un moyen de savoir si une cellule donnée contient un facteur de stimulation ou d'inhibition d'une étape précise du cycle. Les résultats de ces expériences sont montrés dans la *figure* 13.4 ; ils prouvent qu'il existe, dans les cellules en phase S, un composé qui déclenche prématurément la synthèse de l'ADN dans les cellules en G1, mais pas en G2 ; ce **facteur d'entrée dans la**

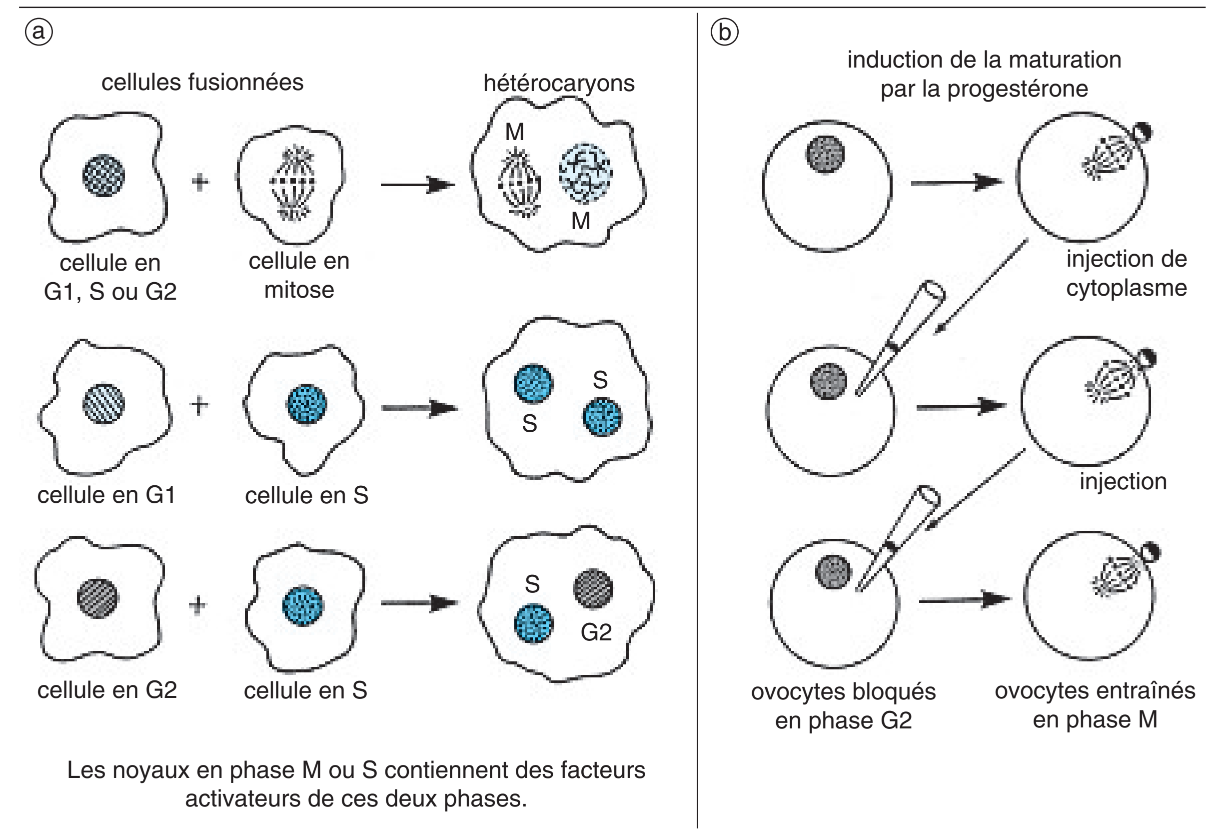


Figure 13.4

Mise en évidence de facteurs cytoplasmiques contrôlant le cycle cellulaire

(a) Expériences de fusions de cellules de Mammifères, permettant de montrer l'existence de facteurs activateurs ou de facteurs inhibiteurs. **(b)** Expériences d'injections dans des ovocytes d'Amphibiens : l'injection de cytoplasme d'une cellule en phase M fait passer un ovocyte du stade G2 au stade M.

phase S n'est donc pas actif sur des cellules ayant déjà dupliqué leur ADN. On montre de la même façon que les cellules en G2 ne contiennent plus cet activateur, pas plus qu'elles ne contiennent d'inhibiteur de cette synthèse.

Lorsqu'on fait fusionner deux cellules dont l'une est en phase M, la seconde voit son noyau «essayer», quelle que soit sa position dans le cycle, de mettre en place des chromosomes de type prophasique. Si ces cellules sont en G1, elles fabriquent des chromosomes constitués d'une seule chromatide, contrairement à la situation normale où ceci se produit après la phase S ; la condensation prématurée des chromosomes a lieu également dans des noyaux en S ou en G2. Ces résultats montrent l'existence, au sein du cytoplasme des cellules en mitose, d'un puissant **facteur d'entrée en mitose**, agissant indépendamment des événements de réplication de l'ADN lui-même. Ce second facteur activateur a été nommé **MPF** (facteur promoteur de la phase M).

• Expériences d'injections dans les ovocytes

L'identification du MPF a été grandement facilitée grâce à l'utilisation de cellules géantes comme les œufs de certains Invertébrés (oursin, étoile de mer) ou Vertébrés (Amphibiens). D'une part, on peut obtenir de grandes quantités de cellules synchronisées en phase G2 de la première division de la méiose (ovocytes) ou en phase M (ovocytes en cours de maturation ou ovules pondus non fécondés), d'autre part, ces cellules ont une taille telle que l'on peut prélever avec des micro-seringues une petite quantité de leur cytoplasme et le réinjecter à d'autres cellules à des stades différents. Les résultats obtenus sont identiques à ceux décrits plus haut, à savoir que ces différents types de cellules en phase M contiennent le MPF (voir *figure* 13.4). De même, on montre que ce facteur activateur de la division est présent de façon cyclique au cours des premiers stades embryonnaires, son activité augmentant au début de chaque mitose et retombant entre deux mitoses.

Une information importante a aussi été fournie par ces expériences avec les ovocytes : la division du cytoplasme et l'activité cyclique du MPF peuvent se dérouler en l'absence de noyaux, ce qui témoigne de l'existence d'une horloge biochimique interne à la cellule, indépendante de la transcription des gènes. On a aussi montré avec ce système modèle que le MPF est une molécule universelle car des extraits de cellules d'Invertébrés variés, de Vertébrés et même de levures, sont capables d'entraîner des ovocytes d'amphibiens en phase M. La purification de ce composé a été obtenue en 1989, et on connaît maintenant le principe de son fonctionnement, qui sera donné plus loin.

1.2.2. Données de la génétique et de la biologie moléculaire : les mutants du cycle chez les levures

Une autre approche très féconde a rejoint l'analyse cellulaire qui vient d'être décrite ; elle a consisté à sélectionner des **mutants conditionnels du cycle** de division chez les levures. Deux espèces ont été utilisées à cet effet : *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* ; la première se divise par bourgeonnement, tandis que la seconde se multiplie de façon classique, par allongement suivi de coupure symétrique. Toutes deux peuvent être propagées en phase haploïde, ce qui permet la sélection de mutations récessives. La recherche de mutants du cycle implique la sélection de mutants conditionnels car, normalement, les mutations qui bloquent le cycle empêchent toute reproduction et conduisent à la perte de la souche (létalité). L'intérêt de ces organismes réside aussi dans le fait que certains stades de leur cycle sont bien identifiables par leur morphologie, et il a ainsi été possible, après mutagenèse, de cribler visuellement des mutants bloqués dans leur développement.

Dans chaque espèce, plus de 50 gènes concernant le cycle ont ainsi été mis en évidence, dont les produits ont été identifiés au plan biochimique. Plusieurs protéines banales : enzymes de fourniture des précurseurs, ADN polymérase, ligase, etc., conduisent à l'arrêt des cellules en phase S lorsqu'elles sont mutées. À côté d'elles cependant, ont été identifiées des molécules jouant un vrai rôle de contrôle du cycle : protéines-kinases, facteurs de transcription, cyclines, etc., dont nous verrons l'importance plus loin. Toutes les mutations isolées concernent une dizaine d'événements clefs et se répartissent en trois groupes permettant de définir trois séquences principales déterminant le cycle : les séquences cytoplasmique, chromosomique et centrosomique (bien qu'il n'y ait pas de centrosome classique chez la levure). Ces voies sont relativement indépendantes les unes des autres, mais au sein de chacune d'elles les événements sont bien ordonnés et ne peuvent se dérouler que si les précédents sont effectués.

L'importance des levures est enfin liée au fait qu'elles ont permis une approche moléculaire rapide du problème. La possibilité de les transformer par des plasmides recombinés a autorisé le clonage des gènes sauvages restaurant les fonctions perdues chez les mutants (complémentation fonctionnelle), et donc l'identification des protéines codées. L'universalité du système de contrôle mis en évidence, et la puissance de l'outil utilisé, se sont manifestées lorsqu'on a observé que des gènes clonés d'Animaux pouvaient compenser, après transformation, des déficiences chez la levure.

1.2.3. Modèle biochimique du contrôle du cycle cellulaire

Le fonctionnement cyclique des cellules en prolifération est nécessairement basé sur l'existence de protéines qui ont elles-mêmes une activité cyclique, comme l'exemple du MPF l'a montré plus haut. Le principe est donc celui d'un «**oscillateur biologique**», dont le fonctionnement est universel. Le cœur de ce système est en fait un complexe protéique constitué de deux catégories de molécules, dont l'une est présente en quantité constante tout au long du cycle cellulaire, tandis que l'autre est présente en quantité croissante pendant une phase donnée du cycle, puis disparaît brutalement à la fin de celle-ci (voir *figure* 13.5). La première des deux protéines est une enzyme de type **protéine-kinase**, c'est-à-dire qu'elle est capable de phosphoryler d'autres protéines grâce à l'ATP ; cette enzyme (nommée **CDK** : kinase dépendante de la cycline) est cependant inactive si elle reste seule. La deuxième protéine est une molécule activatrice de la première, et elle constitue en fait la sous-unité régulatrice du complexe formé ; sa concentration variable au cours du cycle cellulaire lui a fait donner le nom de **cycline**. Le fonctionnement conjoint de ces deux molécules est responsable de la progression des cellules le long du cycle.

On distingue deux classes principales de cyclines : les **cyclines G1**, qui permettent l'entrée en phase S, et les **cyclines mitotiques**, qui permettent l'entrée en phase M. Ces dernières sont directement responsables de l'activité oscillante du MPF et sont à l'origine du déclenchement de la division ; leur dégradation lors de la métaphase de la mitose (ou de la méiose) entraîne la perte de l'activité protéine-kinase du complexe et permet à la cellule de retourner en interphase. Bien que l'accumulation des cyclines soit progressive, l'activité kinase apparaît en revanche de façon brutale et est

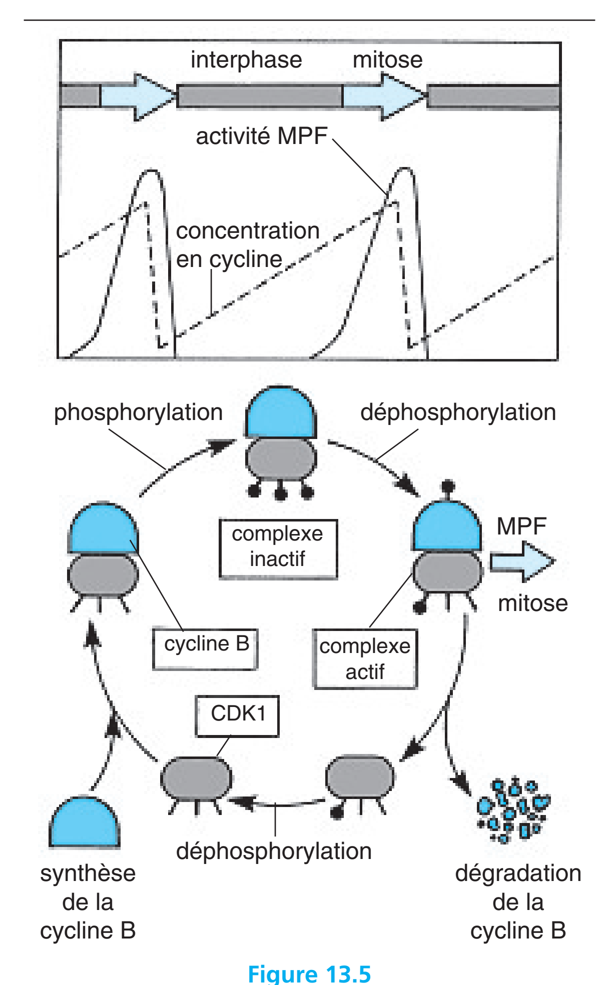


Figure 13.5

Rôle de la cycline dans l'activation du complexe stimulateur de la mitose (MPF)

(a) Évolution de la quantité de cycline au cours du cycle cellulaire et de l'activité MPF. **(b)** Fonctionnement oscillant d'un complexe formé par une protéine-kinase cycline dépendante (CDK) et une cycline. L'activité kinase n'apparaît que lorsqu'un certain seuil de concentration en cycline est dépassé dans la cellule ; la cycline est responsable de sa propre destruction, après activation par phosphorylation d'une protéase qui lui est spécifique.

très localisée dans le temps. L'explication de ce phénomène est très complexe et elle ne peut être détaillée dans le cadre de cet ouvrage. En bref, il s'agit d'un équilibre entre des activités de phosphorylation et de déphosphorylation des cyclines et des CDK, l'activité du complexe dépendant de son degré de phosphorylation ; le phénomène est en outre modulé par de petites protéines inhibitrices de la division, qui se fixent sur ces deux molécules.

Le contrôle du cycle est relativement simple chez la levure où l'on connaît un seul type de CDK et deux familles de cyclines seulement (A pour G1 et

B pour G2). En revanche, il est très compliqué chez les cellules de Mammifères en culture où on a identifié au moins sept CDK différentes, intervenant à différents moments de l'interphase (4,6,2 en G1 ; 2 en S ; 1 en G2), et au moins dix types de cyclines (D et E en G1 ; A en S ; A et B en G2), qui forment avec elles des complexes spécifiques s'activant ou s'inhibant séquentiellement pour contrôler les différentes phases du cycle. L'activité protéine-kinase du complexe CDK-cycline B mitotique (MPF) est responsable des événements caractéristiques du démarrage de la division cellulaire ; on peut citer, par exemple :

– la phosphorylation des lamines, qui conduit à leur dissociation de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire et donc à sa disparition ;
– la phosphorylation des histones (en particulier H1), qui entraîne des changements d'organisation de la chromatine et la condensation des chromosomes ;
– la phosphorylation de certaines protéines du cytosquelette (MAPs, filaments intermédiaires), qui provoque des remaniements profonds de ce dernier et l'assemblage de l'appareil mitotique.

2. CONTRÔLE DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES CHEZ LES ORGANISMES PLURICELLULAIRES

2.1. Considérations générales

2.1.1. Nécessité des contrôles

Les stratégies de contrôle de la prolifération sont très différentes selon qu'il s'agit d'êtres unicellulaires ou pluricellulaires. Chez les premiers, ce sont les facteurs environnementaux et trophiques qui sont déterminants (voir chapitre 12). Dans les conditions normales de vie, la durée de la phase G1 est ajustée de sorte que les cellules aient atteint la même taille que la cellule-mère avant de se diviser, pour des raisons bien évidentes. L'apport en nutriments est un paramètre qui influence directement la durée du cycle cellulaire ; on peut, en effet, prolonger à volonté la phase G1 et retarder la division de ces cellules, simplement en causant une carence alimentaire ou en inhibant la synthèse des protéines. Il existe donc, pendant cette phase, un phénomène d'appréciation de la taille par la cellule elle-même, dont les mécanismes sont inconnus. Chez les Animaux, où les cellules sont organisées en tissus massifs, ce sont des signaux chimiques provenant d'autres cellules, c'est-à-dire des **hormones** ou des **facteurs de croissance**, qui déclenchent ou inhibent les divisions chez les cellules qui leur sont réceptives.

Il existe un équilibre fragile entre trois destinées possibles, pour les cellules appartenant à un tissu donné : la différenciation, la prolifération et une mort dite « programmée ». Nous verrons que les mécanismes mis en jeu pour assurer cet équilibre sont d'une grande complexité et par conséquent très sensibles à des déréglements souvent dramatiques pour l'organisme. Trois sortes de gènes impliqués dans ces trois volets de la vie des cellules ont été identifiés : les proto-oncogènes (à l'origine de signaux positifs), les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de l'apoptose (à l'origine de signaux négatifs) ; ils peuvent subir des altérations touchant la structure du produit formé, mais surtout la régulation de sa production.

2.1.2. Cellules souches et homéostasie tissulaire

Nous avons déjà signalé qu'au sein des organismes complexes, les cellules ont des durées de cycle très variables selon les tissus. À côté de cellules spécialisées qui ne se divisent plus après leur différenciation (cellules musculaires, nerveuses, etc.), on en connaît qui se multiplient régulièrement et à un rythme rapide (**cellules-souches** ; voir chapitre 14 et « Perspective biomédicale »). Entre ces extrêmes, il en existe qui se divisent très lentement ou pas du tout, mais qui peuvent être stimulées naturellement ou artificiellement (cellules hépatiques, lymphocytes, etc.). Contrairement à ce que l'on a dit pour les unicellulaires, les cellules ont ici accès à d'abondantes sources de nutriments, et ce paramètre n'est pas déterminant dans le contrôle du cycle. Un organisme constitue une communauté au sein de laquelle certains groupes de cellules règlent le développement des cellules qui les entourent. Ces contrôles stricts ont pour résultat un parfait équilibre entre le renouvellement des cellules et leur mort, et c'est grâce à cette coordination que chaque organe conserve une taille et une architecture appropriées au sein de l'organisme (notion d'**homéostasie**).

2.2. Facteurs de croissance et signalisation intercellulaire

2.2.1. Diversité des facteurs stimulant la division ou la différenciation

Chez les Animaux, la multiplication, la croissance et la différenciation des cellules sont contrôlées par des facteurs protéiques de faible masse moléculaire, sécrétés par elles-mêmes (**action autocrine**) ou par d'autres types cellulaires, et qui diffusent à courte distance dans le milieu intérieur (**action paracrine** ; voir chapitre 13). L'existence de tels composés est soupçonnée depuis longtemps car les cultures continues de cellules animales ne peuvent être obtenues que si des extraits organiques (du sérum de veau fœtal, par exemple) sont ajoutés aux milieux nutritifs classiques. La nature exacte des substances actives contenues dans ces extraits a seulement été établie à une date relativement récente (années 60).

On a identifié, chez les Vertébrés, plus d'une cinquantaine de ces médiateurs de la communication intercellulaire, appelés aussi **cytokines**, qui agissent très localement et à des concentrations infimes (10^{-12} à 10^{-9} M). Le plus souvent, ce sont en fait des combinaisons précises de ces substances qui stimulent la division de types cellulaires donnés ; on peut citer quelques exemples classiques :

– le **PDGF** (facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines) est une protéine permettant, *in vitro* comme *in vivo*, la multiplication des fibroblastes et des fibres musculaires lisses ; son rôle est très important dans la cicatrisation ;
– le **NGF** (facteur de croissance du nerf) favorise la croissance des axones et permet la survie de plusieurs types de neurones ;
– l'**EGF** (facteur de croissance de l'épiderme) stimule, de façon peu spécifique, la prolifération des cellules de l'épiderme et de divers autres types cellulaires. Son mécanisme d'action sera étudié plus loin

De très nombreux facteurs de ce type, nommés **interleukines**, sont impliqués dans la multiplication et la différenciation des cellules sanguines. Ils interviennent dans la communication entre familles de leucocytes et règlent la réponse immunitaire (lymphokines) ; on peut aussi citer l'**érythropoïétine**, facteur circulant qui stimule exclusivement la multiplication des cellules à l'origine des globules rouges. Certains de ces composés sont très spécifiques d'un type cellulaire donné, tandis que d'autres sont plus généraux et exercent des fonctions variées dans plusieurs domaines ; de plus, selon le type de cellule réceptrice, un même facteur peut induire des effets biologiques différents. On connaît aussi quelques protéines dont le fonctionnement est très voisin mais qui, contrairement aux précédentes, ont un effet inhibiteur sur le cycle en allongeant fortement le temps de génération (par blocage en G1) ; c'est le cas des **interférons**, par exemple, dont la production est stimulée dans toutes les cellules par les infections virales, et qui sont souvent utilisés dans la lutte anticancéreuse.

2.2.2. Principes généraux des voies de signalisation

Toutes ces protéines se lient à des **récepteurs** à très haute affinité, portés par la membrane plasmique des cellules-cibles, et qui induisent à travers elle une cascade complexe de signaux intracellulaires. Ces voies de signalisation consistent essentiellement en une série de phosphorylations de protéines cytoplasmiques, catalysées par des protéines-kinases, qui entraînent une stimulation de la division ou de la différenciation cellulaire. Dans le noyau, ce sont des **facteurs de transcription** spécifiques qui, après phosphorylation, activent finalement les gènes impliqués dans l'ensemble de ces fonctions, en particulier les cyclines G1. Une fois ce point de non-retour franchi par la cellule, les facteurs de croissance ne sont plus indispensables pour la réalisation des étapes suivantes. Il est aisé de comprendre que toute altération affectant les gènes codant ces protéines entraîne forcément des dérèglements du programme du cycle cellulaire. Nous verrons plus loin que ceux-ci, sous la forme des cancers, peuvent avoir des répercussions graves sur le fonctionnement de l'organisme entier.

2.3. Contacts intercellulaires ou avec la matrice extracellulaire

Après avoir analysé comment des cellules différentes peuvent contrôler leur prolifération respective par l'intermédiaire des facteurs de croissance, nous allons brièvement examiner le cas où les cellules d'un même tissu sont amenées à interagir pour réguler leur propre densité de population. L'exemple le plus classique est celui des cultures de cellules animales dans lesquelles on observe le phénomène dit d'**inhibition de contact** : après ino-

culation du milieu de culture, les cellules se fixent sur la surface de la boîte de Petri et se divisent jusqu'à former une monocouche confluente. Malgré les apparences, il est vraisemblable que le signal d'arrêt de la division dans la population n'est pas dû aux contacts établis entre les cellules à ce moment-là, ou à l'absence de nutriments dans le milieu, mais plutôt à un déficit de facteurs de croissance. En fait, il existe une compétition entre les cellules pour ces composés qui se trouvent toujours dans le milieu en concentrations infimes, et il suffit d'en rajouter dans la boîte de culture pour stimuler une vague de divisions. Bien qu'il soit plus difficile à démontrer, ce genre de phénomène doit aussi exister *in vivo*. Nous verrons enfin dans le chapitre 14 de quelle manière les **matrices extracellulaires** que fabriquent certaines cellules sont capables de contrôler leur multiplication.

3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE

Ces mécanismes sont basés sur l'intervention de 4 types de molécules :

- des signaux chimiques, émis par certaines cellules en direction des cellules cibles,
- des récepteurs, qui sont des protéines membranaires ou des protéines solubles dans le cytosol, reconnaissant très spécifiquement leur ligand,
- des molécules intermédiaires de signalisation, qui constituent une cascade de transduction depuis le récepteur jusqu'aux molécules déclenchant la réaction finale,
- des molécules cibles, qui sont des enzymes, des transporteurs membranaires, des protéines du cytosquelette ou des facteurs de transcription. La rapidité de la réponse cellulaire varie selon qu'elle implique des protéines préexistantes (ms ou sec), ou qu'elle nécessite leur néosynthèse (heures).

3.1. Les principaux types de molécules de signalisation et de récepteurs

Les molécules informatives déclenchant les processus de communication sont très variées : protéines, peptides, acides aminés ou dérivés, acides gras ou dérivés, nucléotides, stéroïdes, rétinoïdes et même certains gaz (NO, éthylène chez les Végétaux) ; en général de nature hydrophile, il en existe aussi qui sont hydrophobes. Elles sont envoyées vers les cellules cibles, à des distances plus ou moins grandes ; les modes de transmission à l'échelle de l'organisme seront brièvement décrits dans le chapitre 14.

3.1.1. Les récepteurs cytoplasmiques

Ils concernent des molécules de petite taille, hydrophobes et diffusant aisément à travers la membrane plasmique : hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, dérivés de l'acide rétinoïque et vitamine D. Bien que très différents, tous ces signaux ont un mode d'action voisin. Leurs récepteurs sont intracellulaires et restent cytosoliques tant qu'ils n'ont pas fixé leur ligand, mais quand ce dernier l'a été, ils rentrent dans le noyau (car la séquence signal d'adressage a été dévoilée). Ils fonctionnent comme des facteurs de transcription et contrôlent l'activité de gènes spécifiques en se fixant sur leurs promoteurs. Leur action est donc directe et très rapide.

3.1.2. Les récepteurs membranaires et leur diversité

La plupart des ligands intervenant dans la signalisation sont hydrophiles et ne franchissent pas les membranes ; ils se lient à des récepteurs de la membrane plasmique des cellules cibles. La majorité des récepteurs de surface agit en entraînant une modification d'activités enzymatiques intracellulaires qui agissent en cascade jusqu'à la réponse finale de la cellule, mais certains d'entre eux sont des canaux ioniques régulés par un ligand. On distingue 4 catégories principales de récepteurs membranaires :

- les **récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques**. Ce sont les plus nombreux ; ils présentent tous la même structure, avec 2 gros domaines extra et intracellulaires et 7 hélices transmembranaires (pour leur structure détaillée, voir fig. 5.21). Ils constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires chez les Eucaryotes et représentent environ 5 % du génome de *Caenorhabditis* ; plusieurs milliers de gènes apparentés ont été identifiés chez les

Mammifères (près de 1000 d'entre eux seraient impliqués dans la perception des odeurs chez les Mammifères : récepteurs olfactifs). Ils se lient à des ligands extracellulaires très variés (hormones, neurotransmetteurs, ou médiateurs locaux), et les réponses cellulaires qu'ils entraînent le sont également. Le récepteur β adrénergique, étudié dans le chapitre 7, et répondant à l'adrénaline, en est un exemple. La fixation du ligand sur ces récepteurs induit chez eux un changement de conformation qui est reconnu par les protéines G associées, qui s'y fixent (voir plus loin).

– les **récepteurs-canaux**. L'exemple classique est celui du récepteur à l'acétylcholine (dit nicotinique), situé dans le muscle squelettique, et qui a été signalé dans le chapitre 6. La fixation de l'acétylcholine sur ce canal cationique induit son ouverture et un flux ionique massif, et donc une réponse cellulaire instantanée.

– les **récepteurs catalytiques à activité tyrosine kinase**. Plus de 50 récepteurs de ce type sont connus ; spécifiques des multicellulaires, ils ont en commun d'être des protéines transmembranaires à passage unique, avec un domaine C terminal catalytique interne. La plupart sont des polypeptides simples (monomères), d'autres sont des dimères (récepteur de l'insuline). Leurs ligands extracellulaires sont des facteurs de croissance (EGF, FGF, NGF, PDGF) ou l'insuline. Le prototype de ces récepteurs est celui de l'EGF, dont la cascade de signalisation induite, dite des **MAP kinases**, sera décrite en détail plus loin. La fixation du ligand entraîne le plus souvent une dimérisation des récepteurs monomériques, ce qui permet le rapprochement, du côté cytosolique, des domaines catalytiques (à activité tyrosine kinase) qui se phosphorylent de façon croisée : autophosphorylation. Ceci enclenche une cascade de réactions de phosphorylation d'autres protéines (voir plus loin).

– les **récepteurs non catalytiques couplés à des protéines à activité tyrosine-kinase**. Le principe de leur fonctionnement est voisin de ce qui vient d'être décrit, sauf que ce sont des protéines associées qui sont catalytiques, et non pas les récepteurs eux-mêmes (voir plus loin). Leurs ligands sont, par exemple, les cytokines ou l'hormone de croissance (GH).

De nombreuses maladies génétiques sont dues à des mutations touchant ces récepteurs, comme le montre l'encart suivant.

ENCART BIOMÉDICAL

Dysfonctionnements hormonaux et récepteurs membranaires

On connaît des maladies, héréditaires ou non, dues à des mutations touchant les récepteurs membranaires ou leurs protéines G associées (stimulatrices ou inhibitrices). Quelques exemples concernant des hormones sécrétées par l'hypophyse, qui sont capitales pour l'homéostasie de l'organisme, peuvent être donnés (voir aussi la fig. 5.21 et l'encart chapitre 9).

Le diabète insipide congénital est une maladie génétique rare, parfois fatale, se traduisant par une diurèse abondante et une forte déshydratation. Il est dû à une anomalie du récepteur de l'hormone anti-diurétique (ADH, ou vasopressine), dans certaines cellules du rein. L'hormone, produite par la neurohypophyse, est reconnue et fixée par le récepteur muté, mais ce dernier est incapable de transmettre le signal à la protéine G qu'il commande : la cascade n'est pas enclenchée et la cellule ne répond pas au stimulus. On a donc ici un défaut de fonctionnement lié à une mutation ponctuelle (souvent un codon stop).

L'adénome bénin de la thyroïde est une tumeur produisant de façon non contrôlée l'hormone thyroïdienne (hyperthyroïdisme). Normalement, cette glande ne sécrète l'hormone que si elle est stimulée par une autre hormone fabriquée par l'adénohypophyse : la TSH (thyréotrophine). Dans ce cas, on a montré qu'une mutation ponctuelle du gène du récepteur de la TSH est responsable de la stimulation continue de la protéine G correspondante, d'où la sécrétion excessive et constitutive de l'hormone et l'apparition de la prolifération cellulaire. Il s'agit d'une maladie non héréditaire, liée à une mutation ayant affecté une seule cellule de la thyroïde (mutation somatique).

Il existe d'autres pathologies dues à un dysfonctionnement des hormones hypophysaires, et concernant leurs récepteurs ou les protéines G associées. Des récepteurs déficients pour l'hormone adréno-corticotrope (ACTH, ou corticotrophine) ou la LH (gonadotrophine) sont responsables respectivement de problèmes de sécrétion des glucocorticoïdes par la glande surrénale, ou de syndromes sexuels tels qu'une puberté précoce.

3.2. Les protéines associées aux récepteurs

Seuls quelques exemples de la diversité considérable de ces protéines seront présentés.

3.2.1. Protéines G hétérotrimériques

Ces protéines lient le GTP en l'échangeant contre un GDP. Elles sont constituées de trois sous-unités (α, β, γ), et localisées sur la face interne de la membrane plasmique ; les sous unités α et γ sont ancrées dans la bicouche par des acides gras (voir chapitre 6). La fixation de la protéine G (sous forme GDP) au récepteur associé activé induit la séparation de la sous unité α des deux autres, ce qui s'accompagne de l'échange GDP contre GTP ; la protéine devient alors active. Par diffusion latérale dans la bicouche, la sous-unité Gα entre en contact avec d'autres protéines membranaires, qui seront activées à leur tour. Il existe différentes protéines G (stimulatrices, ou inhibitrices), qui reçoivent des signaux de divers récepteurs et stimulent en aval de nombreuses cibles. Elles diffèrent par leurs 3 sous-unités : on connaît plus de 15 gènes pour α, 5 pour β et 10 pour γ, chez l'Homme, ce qui permet un nombre élevé de combinaisons. Elles hydrolysent spontanément, mais lentement (sec. ou min.), le GTP en GDP, ce qui met fin au processus de signalisation ; les trois sous-unités se rassemblent ensuite pour former la protéine G inactive.

3.2.2 Protéines associées aux récepteurs liés à une activité tyrosine kinase

Dans le cas des récepteurs catalytiques, l'autophosphorylation est reliée à la réponse cellulaire grâce à des protéines adaptatrices reconnaissant des phosphotyrosines (exemple de l'EGF donné plus loin). Les récepteurs non catalytiques sont associés, au niveau de leurs domaines intracellulaires, à des protéines kinases (JAK2) qui se phosphorylent mutuellement lors de la dimérisation des récepteurs, et peuvent phosphoryler d'autres protéines ; c'est le cas, par exemple, de STAT, qui est un facteur de transcription.

3.3. Les messagers secondaires et les cascades induites

Les **messagers secondaires** sont des petites molécules cytosoliques, diffusibles, dont les concentrations varient brusquement sous l'action de la réception du signal, et qui enclenchent les cascades : AMP cyclique (AMPc), inositol triphosphate (IP3), diacylglycérol (DAG), par exemple. Ils sont un moyen d'amplification considérable du signal initial car un seul récepteur activé peut faire passer plusieurs centaines de protéines G inactives sous la forme active, qui peuvent elles-mêmes conduire à la production de milliers de molécules d'AMPc, et ainsi de suite. Ils sont parfois communs à plusieurs voies, ce qui permet une intégration des réponses cellulaires. Deux exemples de cascades, parmi une multitude, seront décrits.

3.3.1. Voies impliquant les protéines G

Deux voies majeures de transduction sont enclenchées par les protéines G : la **voie de l'AMPc** et la **voie des phosphoinositides** et du calcium.

– La voie de l'AMPc a été brièvement illustrée dans le chapitre 7, avec l'exemple de la dégradation du glycogène dans les cellules hépatiques et le muscle, provoquée par l'adrénaline et les récepteurs dits β adrénergiques. L'adénylate cyclase (protéine à 12 hélices transmembranaires) est stimulée par une protéine Gs à produire l'AMPc, qui active une protéine kinase, dite PKA (voir *figure* 7.11). Après phosphorylation en série et activation de deux protéines (phosphorylase kinase et glycogène phosphorylase), cette cascade conduit à la production de glucose 1-P.

– La seconde voie met en jeu une phospholipase (dite C), activée par une protéine Gs ; cette enzyme hydrolyse un lipide membranaire (le PIP2) et donne de l'IP3 et du DAG. Ces deux produits sont des messagers secondaires : le premier provoque la libération brusque dans le cytosol de Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique, dont les effets sont multiples ; le second active une protéine kinase Ca^{2+} dépendante (PKC), qui active ensuite une cascade de phosphorylations aboutissant à la transcription de gènes spécifiques. Le Ca^{2+} cytosolique exerce son action via une petite protéine qui le fixe, la calmoduline, qui active elle-même des kinases ou des phosphatases.

Certaines protéines G contrôlent directement des canaux ioniques ; c'est le cas de l'action de l'acétylcholine sur le muscle cardiaque, assurée par un récepteur (dit muscarinique) couplé à une protéine G inhibitrice de l'adénylate cyclase et ouvrant des canaux K+, ce qui ralentit le cœur.

3.3.2. Voies des MAP kinases : l'exemple de l'EGF et de la prolifération cellulaire

En plus des protéines classiques des voies de transduction (facteurs de croissance, récepteurs membranaires et protéines transductrices du signal) le contrôle de la prolifération des cellules de Mammifères est assuré par 2 catégories de protéines intervenant séquentiellement : 1) des facteurs de transcription nucléaires, contrôlant l'expression de certains gènes, 2) des protéines qui activent directement le cycle cellulaire et la division. Sous une forme mutée, toutes ces protéines, sauf les premières, ont été identifiées comme des oncogènes (oncoprotéines ; voir plus loin). La **voie des MAP** (mitogenic activated protein) **kinases**, impliquée dans le déclenchement de la mitose, est universelle chez les Eucaryotes ; les « substances mitogènes », au sens strict, sont définies comme des facteurs stimulant la division cellulaire (plus de 50 sont connus). La question est de savoir comment fonctionne la voie de transduction du signal, à partir du récepteur activé, jusqu'à la réponse finale ; trois niveaux de phosphorylations sont en fait mis en œuvre, comme le montre l'exemple de l'intervention de l'EGF.

L'EGF est le prototype des facteurs mitogènes, qui interviennent au cours du développement embryonnaire (où il agit comme signal inducteur) et chez l'adulte. C'est un polypeptide de 53 acides aminés, produit par le clivage d'un gros précurseur transmembranaire contenant plusieurs modules identiques. Il agit à l'état de monomère, car il reconnaît deux récepteurs à la fois. Son récepteur dimérisé devient actif (après autophosphorylation) et recrute la protéine **Grb2**, via un domaine reconnaissant des tyrosines phosphorylées. Puis Grb2 recrute la protéine **Sos**, qui favorise l'échange de GTP au niveau d'une petite protéine G monomérique membranaire : **Ras**. Cette protéine, fixée dans la bicouche par deux ancres lipidiques, est un composant central dans la transduction du signal (commutateur moléculaire). Ras activée par le GTP s'associe en effet à la protéine **Raf** et l'active ; Raf est une protéine kinase (MAP KKK), qui phosphoryle et active la protéine **Mek** (MAP KK). Mek activée phosphoryle à son tour une MAP kinase (MAP K) : **Erk**, qui phosphoryle des protéines cytosoliques ou nucléaires. Dans le noyau, elle phosphoryle divers facteurs de transcription préexistants, tels que Elk.

C'est ainsi que les mitogènes stimulent en G0 la transcription de deux familles de gènes successifs, dits précoces (facteurs de transcription : Jun, Fos), puis tardifs (activés par les facteurs précédents). Parmi les protéines synthétisées lors de la réponse tardive, les cyclines de la phase G1 (D et E), ainsi que des Cdk (4, 6, 2), déclenchent directement la mitose. On comprend bien, avec cette cascade complexe, l'origine de certains cancers ; le récepteur à l'EGF peut en effet être muté et devenir constitutif (actif en l'absence du ligand). C'est le cas de l'oncogène ErbB, impliqué dans le développement de nombreuses tumeurs du sein et de l'ovaire, qui cause la perte du domaine extracellulaire de fixation du ligand. De même, les mutations de Ras qui empêchent l'hydrolyse du GTP la rendent constitutive, stimulent constamment la prolifération et sont la cause de cancers.

4. DÉRÉGULATIONS DU CYCLE CELLULAIRE : APOPTOSE ET CANCER

L'étude du contrôle du cycle cellulaire montre qu'il existe deux types de mécanismes antagonistes, les uns stimulateurs de la prolifération, liés aux facteurs de croissance, les autres inhibiteurs, intervenant lors des processus de vérification du bon déroulement du programme de division, ou du déclenchement de l'apoptose. Leur action coordonnée régit normalement les différentes étapes du cycle et du développement des cellules, et toute défaillance des gènes qui sont impliqués conduit forcément à une multiplication incontrôlée de celles-ci.

4.1. Mort « naturelle » et mort programmée des cellules

4.1.1. Le rôle de la télomérase

La mort « naturelle » des cellules des organismes pluricellulaires est programmée génétiquement. Il a été montré en effet, grâce à des cultures de cellules de Mammifères, que celles-ci ne peuvent pas

accomplir plus de 50 générations environ ; passé ce stade, les cellules ralentissent leur croissance, cessent de se diviser (passent en G0) et finissent par mourir. Cette limite, qui est caractéristique de l'espèce étudiée et fonction de l'âge du donneur, est inscrite dans le patrimoine génétique de l'organisme. On pense que l'arrêt des divisions est lié à l'absence, dans ces cellules, d'une enzyme nommée **télomérase**. Il s'agit d'une enzyme de type ribonucléoprotéine, qui est capable de répliquer l'ADN très particulier qui forme les télomères ; ce dernier est en fait constitué de plusieurs centaines ou milliers de séquences répétées en tandem, formées d'un motif simple de 6 paires de bases.

Dans les cellules somatiques, qui ne contiennent pas de télomérase, la longueur des télomères est raccourcie de quelques dizaines de motifs à chaque division. Lorsque ces derniers ont complètement disparu, au bout d'une cinquantaine de cycles, apparaît un signal qui entraîne la cellule vers la sénescence et la mort. Seules les cellules pourvues d'une activité télomérase peuvent se diviser de façon indéfinie (cellules immortelles) ; c'est le cas des cellules de la lignée germinale chez les Animaux, mais aussi des cellules cancéreuses, chez qui ce gène est activé de façon anormale.

4.1.2. L'apoptose chez les Animaux et les Végétaux

La **mort programmée**, ou **apoptose**, désigne un événement de mort cellulaire fondamentalement différent de la mort par accident ou par nécrose, puisqu'il s'agit d'un phénomène contrôlé et provoqué par la cellule elle-même (suicide). Elle se manifeste par une séquence reproductible de symptômes caractéristiques tels que le gonflement du noyau, la désorganisation de la chromatine et la dégradation de l'ADN, l'émission par la cellule de prolongements cytoplasmiques qui se détachent du corps cellulaire, etc. Chez les Animaux, les fragments de cellules contenant des micronoyaux sont enfin phagocytés par des cellules spécialisées.

Chez les Animaux, on connaît un grand nombre de situations où ce phénomène naturel intervient, et en particulier, de façon un peu paradoxale, au cours du développement embryonnaire. La disparition sélective de divers tissus, qui participe au modelage de l'embryon, résulte en effet d'une mort cellulaire contrôlée. Chez l'Homme adulte, le renouvellement cyclique des cellules de certains organes (utérus et cycle ovarien) relève de ce mécanisme, et plusieurs maladies neurodégénératives ou auto-immunes sont liées à des dysfonctionnements de ce dernier. On peut citer les exemples de la destruction :

- de la queue et des branchies du têtard chez les Anoures ;
- de la palmure interdigitale dans la construction de la main ;
- des neurones qui n'ont pas contracté de synapses ;
- des lymphocytes excédentaires lors d'une réponse immunitaire, etc.

Des cas semblables existent chez les Végétaux, bien qu'ils soient moins nombreux :

- la mort des cellules à l'origine des vaisseaux conducteurs ;
- l'abcission des feuilles, la sénescence des pétales et des cotylédons ;
- la destruction de cellules au cours du développement de l'embryon et de la graine, etc.

L'importance et le caractère universel de la mort programmée sont identifiés depuis quelques années seulement, et le déterminisme génétique de ce processus reste mal connu. Un certain nombre de gènes intervenant dans son contrôle ont cependant été découverts ; ils sont conservés chez tous les Animaux, depuis les Nématodes jusqu'aux Mammifères. Le réseau d'interactions entre les facteurs qui déterminent la prolifération des cellules et ceux qui conduisent à leur mort est d'une complexité telle qu'il n'est pas possible de le décrire ici. On retiendra simplement que plusieurs gènes concernant le cycle cellulaire, et en particulier celui codant la **protéine P53** (voir plus loin), participent au déclenchement du suicide cellulaire.

4.2. L'origine génétique des cancers

4.2.1. Le développement des tumeurs

Une cellule devient cancéreuse lorsqu'elle échappe aux contrôles normalement exercés par les autres cellules de l'organisme (**oncogenèse**). N'obéissant plus qu'à son propre programme de multiplication, elle se divise de façon continue et forme une tumeur ; elle quitte parfois son lieu d'origine pour aller coloniser des organes qui,

lorsqu'ils sont vitaux pour l'organisme, s'altèrent rapidement et deviennent non fonctionnels (métastases). Les **cancers**, dont on connaît plus d'une centaine de formes, sont dus à des mécanismes génétiques communs. On sait aujourd'hui qu'une tumeur se développe toujours selon un nombre d'étapes bien déterminé, histologiquement identifiables, chacune d'elles correspondant à une nouvelle mutation apparue dans un gène participant au contrôle de la croissance cellulaire. L'observation que les cancers résultent de l'accumulation de mutations au sein d'un même clone cellulaire est à la base de la notion d'expansion clonale des cellules tumorales. Une demi-douzaine de gènes mutés sont parfois impliqués avant qu'une tumeur ne devienne invasive et présente un réel danger pour l'organisme (exemple du cancer du côlon).

Toute tumeur dérive en effet d'une seule cellule devenue anormale à la suite de mutations dans l'une ou l'autre des catégories de gènes suivants : les **proto-oncogènes** et les **anti-oncogènes** (ou gènes suppresseurs de tumeurs). Les premiers interviennent normalement dans la stimulation de la division cellulaire, les seconds, en revanche, sont chargés de l'inhiber. Les gènes responsables de l'oncogenèse sont en fait des formes mutées de ces deux types de gènes :

1) les **oncogènes**, qui sont des proto-oncogènes activés, et responsables d'une production constitutive ou d'une surproduction de protéines stimulatrices de la division ;
2) les **anti-oncogènes inactivés**, qui ne sont plus en mesure de fabriquer des protéines inhibitrices de la prolifération.

Tous les gènes codant les protéines intervenant dans les voies de signalisation positive liées aux facteurs de croissance, sont des proto-oncogènes et donc potentiellement des oncogènes. Les molécules concernées sont aussi bien les facteurs de croissance eux-mêmes que leurs récepteurs membranaires, ou toute protéine intervenant dans la séquence de stimulation, jusqu'aux facteurs de transcription contrôlant directement l'expression des gènes. Il est aisé de comprendre, par exemple, qu'un récepteur modifié par mutation peut devenir actif, même en l'absence de son ligand, et stimuler en permanence la division ; de même, on connaît des cas où des facteurs de croissance sont sécrétés de façon continue par des cellules qui y sont elles-mêmes sensibles (action autocrine), et qui donc s'autostimulent, d'où l'emballement du système. Les mutations de ce type sont dominantes, car il s'agit d'un gain de fonction. Un grand nombre d'oncogènes ont été découverts dans les génomes des **Rétrovirus** (voir chapitre 15).

4.2.2. Mécanismes moléculaires

Pour illustrer le rôle des anti-oncogènes, on peut décrire celui de la molécule dite **P53**. Cette protéine est un facteur de transcription contrôlant l'activité de nombreux gènes, certains étant stimulés et d'autres inhibés. Un des gènes ainsi activés code une petite protéine (P21) qui empêche le fonctionnement du complexe CDK/cycline G1 en se fixant dessus, ce qui freine le cycle en bloquant la cellule en G1. Lorsque les cellules sont soumises à un stress ou que leur ADN a été accidentellement endommagé, une production importante de P53 est déclenchée ; le système de sécurité qui est mis en route permet ainsi aux enzymes de réparation de l'ADN de fonctionner. Lorsque celui-ci est réparé, le cycle reprend normalement ; si les lésions sont trop importantes et irréparables, le programme de mort cellulaire est déclenché. Cette opération de vérification de l'état de l'ADN et sa réparation sont des étapes cruciales du cycle ; seules des chromatides en «bon état» seront ainsi dupliquées et transmises aux cellules-filles. Il a été montré que la protéine P53 est mutée et anormale dans 50 % des cancers (et dans 90 % des cancers du poumon !), ce qui témoigne de son rôle important comme frein de la division ; en effet, les cellules mutées se multiplient en accumulant les erreurs dans leur ADN, ce qui conduit fatalement à l'apparition de tumeurs. Il faut enfin ajouter que les mutations concernant les anti-oncogènes sont récessives, car elles correspondent à une perte de fonction.

L'apparition spontanée d'un cancer est un processus nécessitant plusieurs étapes et l'altération simultanée d'un grand nombre gènes, au sein d'une même cellule. Le développement d'une tumeur, qui est le résultat de l'accumulation de ces mutations spontanées et aléatoires, demande en général 30 à 40 ans pour se réaliser.

Encart biomédical

Les gènes de prédisposition au cancer

De nombreux cas de cancers apparaissent beaucoup plus tôt, et se développent plus vite (en un à deux ans) chez certains individus que dans la moyenne de la population. Ils se transmettent en outre au sein de familles caractérisées par un risque élevé de survenue : ce sont les cancers familiaux. Le facteur responsable de cette apparition accélérée des tumeurs est en fait un gène (muté) de prédisposition, dont l'individu a hérité à sa naissance et qu'il possède dans toutes ses cellules. Les cancers familiaux du côlon et du sein sont décrits à titre d'exemples.

Deux formes héréditaires des cancers colorectaux sont connues ; la première concerne moins de 1 % des cas : le cancer colorectal familial avec polypose ; la seconde sera évoquée plus loin. Lorsque le gène suppresseur de tumeurs nommé APC est muté au niveau des deux chromosomes homologues, dans une cellule de l'épithélium intestinal, un polype bénin apparaît, qui peut dégénérer plus tard en tumeur maligne. Si l'un des deux allèles est d'emblée hérité sous une forme mutée à la naissance, une seule mutation somatique supplémentaire suffit pour que l'individu porteur devienne homozygote et produise de façon précoce des milliers de polypes, ce qui accroît évidemment la probabilité qu'il développe des tumeurs.

Environ 8 % des cancers du sein et de l'ovaire seraient dus à deux gènes de prédisposition : les gènes BRCA 1 et 2, qui sont aussi des gènes suppresseurs de tumeur. Les femmes porteuses de mutations dans ces gènes ont un risque de cancer du sein près de 10 fois supérieur à celui de la population générale.

Enfin, plusieurs cancers familiaux sont indirectement dus à une défaillance des systèmes de réparation de l'ADN. C'est le cas, par exemple, du *xeroderma pigmentosum* et du cancer colorectal héréditaire sans polypose (voir le chapitre 12). Parmi les gènes mutés persistant à la suite de la non réparation de l'ADN, on retrouve toujours ceux intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire.

Perspective biomédicale

Cellules souches et thérapie cellulaire

L'utilisation des cellules souches en thérapie humaine constitue depuis plusieurs années un sujet scientifique brûlant et très médiatisé car il touche également aux domaines de l'éthique et de la politique. Les perspectives médicales liées à ces «cellules miracles» paraissent révolutionnaires : on imagine que l'on pourra bientôt, grâce à elles, fabriquer à volonté des cellules musculaires, des neurones ou des cellules pancréatiques. Des maladies graves telles que les myopathies, la maladie de Parkinson et le diabète seraient ainsi vaincues.

Il y a en fait plus de quarante ans que le principe de la thérapie cellulaire a été établi et mis en pratique. Les greffes de moelle osseuse se basent sur l'observation déjà ancienne que des cellules souches capables de produire toutes les cellules sanguines existent chez l'adulte. On les utilise pour traiter des sujets ayant été irradiés, souffrant de leucémies ou de diverses pathologies des cellules sanguines ou immunitaires. Le problème majeur reste celui de l'incompatibilité tissulaire et du rejet ; les banques de donneurs compatibles ne répondent pas à tous les besoins. Dans la plupart des cas, un traitement immunosuppresseur, à base de cyclosporine, doit être réalisé. Le sang du cordon ombilical des nouveaux nés, riche en cellules souches, constitue une voie d'avenir prometteuse pour les allogreffes sanguines.

A la fin des années 80, des cellules souches des muscles striés (les cellules satellites), ont été isolées, cultivées en masse *in vitro*, puis injectées dans les muscles de patients atteints de la myopathie de Duchenne. Ces cellules ont effectivement participé à la réparation partielle des tissus lésés. Il est cependant trop tôt pour dire si cette méthode pourra être employée en thérapie.

Les possibilités thérapeutiques offertes par les cellules souches embryonnaires sont en théorie considérables. La production contrôlée (grâce à la connaissance des signaux chimiques inducteurs appropriés), de cellules différenciées à partir de ces cellules humaines en culture, puis leur injection, devrait autoriser le traitement d'organes lésés ou déficients. Le cœur, le cerveau et le pancréas (dont les cellules ne se renouvellent plus), respectivement altérés de façon définitive par un infarctus, la maladie de Parkinson ou le diabète, seraient ainsi réparables. Ici aussi, le problème de la compatibilité tissulaire se pose, et deux voies sont explorées pour résoudre cette difficulté. Tout d'abord, on peut imaginer créer des cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées, n'exprimant pas certaines protéines de leur surface, et qui ne seraient pas reconnues comme étrangères par le receveur après transplantation. Ces cellules, de type «donneur universel», pourraient donc être injectées à tout le monde ; leur réalisation semble encore très lointaine.

La deuxième solution mettrait en œuvre la technique déjà bien connue du clonage. La purification de noyau(x) de cellules somatiques du patient (de peau, par exemple) serait suivie de leur injection dans un œuf humain non fécondé, après élimination de ses chromosomes. Le déclenchement du développement embryonnaire et sa poursuite jusqu'au stade blastocyste permettrait d'obtenir des cellules souches embryonnaires dont on dirigerait à volonté la différenciation. Ces cellules ont la même information génétique que celles du receveur, et elles seraient donc compatibles avec ses tissus lésés, qui pourraient être guéris.

Cette méthode, dite abusivement du «bébé médicament», pourrait également être utilisée dans le cas de maladies génétiques incurables. Un embryon précoce normal issu d'une même fratrie serait employé spécialement comme source de cellules souches pour guérir un jeune malade. Toutes ces manipulations soulèvent de nombreuses interrogations et suscitent des débats passionnés ; elles sont autorisées en France depuis quelques mois seulement.

Résumé

Le cycle cellulaire standard des Eucaryotes est constitué de deux phases principales : l'interphase et la division ; la première, en général la plus longue, correspond à une période de croissance cellulaire active préparant la division suivante. Elle est découpée en trois étapes successives : G1, S et G2 ; la réplication de l'ADN, qui a lieu pendant le stade S, introduit en effet une discontinuité au cours de l'interphase.

Le cycle cellulaire est étudié par des méthodes cytologiques, utilisant ou non les traceurs radioactifs et l'autoradiographie, qui permettent de mettre en évidence et mesurer la durée de ses différentes phases, dans des populations de cellules en prolifération, synchrones ou non synchrones. Les techniques de la Biologie Cellulaire et de la Biochimie (expériences de fusions de cellules à des stades différents du cycle, ou d'injections d'extraits acellulaires) ont démontré l'existence de facteurs universels stimulant l'entrée en phase S ou M.

L'utilisation de mutants conditionnels, chez la levure, a permis d'identifier de nombreux gènes contrôlant le cycle, ce qui a ouvert la voie à la Biologie Moléculaire. Cette dernière approche a montré que les mécanismes de contrôle du programme de la division sont basés sur l'existence d'un oscillateur biologique universel formé de deux protéines : une CDK, présente en quantité constante, et une cycline, qui disparaît brutalement après son accumulation progressive. Plusieurs complexes voisins de ce type se succèdent au cours du cycle et permettent la progression des cellules dans ses différentes étapes, en assurant une activité de phosphorylation (activatrice ou inhibitrice) des protéines impliquées dans son déterminisme.

Dans les voies de signalisation, deux catégories de récepteurs chargés de recevoir et transmettre le message primaire, sont connues : les récepteurs cytoplasmiques, qui captent des signaux hydrophobes, et les récepteurs membranaires, qui possèdent un domaine extracellulaire de liaison avec un ligand hydrosoluble. Quatre types principaux de récepteurs membranaires existent : 1) ceux couplés aux protéines G, 2) les récepteurs canaux, 3) les récepteurs catalytiques à activité tyrosine kinase et, 4) les récepteurs associés à des protéines à activité tyrosine kinase. Ils transmettent le signal perçu à des protéines qui leur sont associées (et qui seront activées ou inhibées), le plus souvent grâce à des protéines membranaires, spécifiques des voies de signalisation ; les protéines G hétérotrimériques, ou des protéines reconnaissant des phosphotyrosines, en sont des exemples classiques. Les cascades de signalisation enclenchées par la suite mettent en jeu des messagers secondaires qui amplifient considérablement le signal initial.

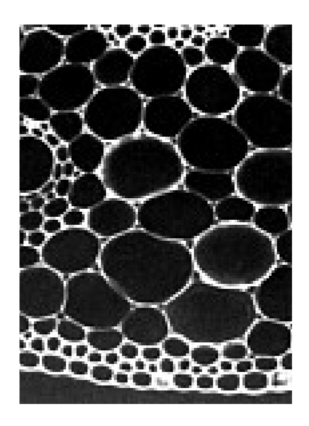
Chez les êtres pluricellulaires, le contrôle de la prolifération des cellules est d'une importance capitale pour le maintien de l'homéostasie tissulaire des individus. Il repose sur l'existence d'un réseau de facteurs de croissance protéiques spécifiques (cytokines), sécrétés par différents types de cellules, et agissant localement à des concentrations infimes. L'EGF est un facteur mitogène qui stimule la division cellulaire en mettant en jeu de multiples phosphorylations en série de protéines cytoplasmiques (voie des MAP kinases).

Le phénomène d'apoptose, qui consiste en une mort cellulaire génétiquement contrôlée, est d'une grande importance chez tous les Animaux et les Végétaux, aussi bien au cours de leur développement que chez l'adulte. Tous les cancers, qui résultent d'une prolifération anarchique des cellules, sont la conséquence de dérégulations du fonctionnement du cycle cellulaire ; ils sont en général dus à des mutations touchant des gènes impliqués dans son contrôle, conduisant soit à leur hyperactivité, soit à leur inactivation.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Décrire quelques méthodes expérimentales permettant d'obtenir des populations de cellules synchrones.
2. Comment mesure-t-on la durée des phases du cycle cellulaire dans le cas d'une culture de cellules synchrones ?
3. Même question dans le cas d'une culture de cellules non synchrones.
4. Décrire les expériences de fusions entre cellules situées à des stades différents du cycle, et montrer en quoi elles ont été fondamentales dans la compréhension du contrôle de la division.
5. Nommer une exception remarquable au schéma classique du cycle cellulaire, rencontrée chez les Animaux.
6. Comment définit-on l'inhibition de contact, et quelles sont les causes possibles expliquant ce phénomène ?
7. Qu'appelle-t-on «mutants conditionnels du cycle» chez la levure, et quel a été leur intérêt fondamental pour la connaissance des mécanismes du cycle cellulaire
8. Présenter le modèle universel de contrôle du cycle cellulaire basé sur le couple de protéines nommées CDK et cyclines.
9. Qu'appelle-t-on facteurs de croissance et quel est leur mode de fonctionnement chez les cellules animales ?
10. Énumérer les quatre types de molécules de base qui interviennent dans toutes les voies de signalisation cellulaire.
11. À quels types de signaux moléculaires les récepteurs cytoplasmiques répondent-ils, et comment ces molécules de signalisation pénètrent-elles dans les cellules ?
12. Décrire le fonctionnement des quatre principales catégories de récepteurs membranaires connues chez les Animaux.
13. Comment les protéines G hétérotrimériques sont-elles organisées, et comment transmettent-elles le signal aux molécules cibles qu'elles contrôlent ?
14. Qu'appelle-t-on «messagers secondaires» ? Nommer ceux qui sont impliqués dans les voies de signalisation mettant en œuvre les protéines G.
15. Rappeler les principales étapes de la voie de signalisation enclenchée par l'EGF et stimulant la prolifération cellulaire ; comment se nomme-t-elle ?
16. Quel est le rôle de la télomérase, et pourquoi cette enzyme est-elle importante dans le contrôle du nombre de divisions effectuées par les cellules somatiques ?
17. Quels rapports existe-t-il entre le contrôle du cycle cellulaire et les cancers des Animaux ? Nommer deux catégories importantes de gènes impliqués dans l'oncogenèse.
18. Donner la définition de l'apoptose et citer quelques exemples de ce phénomène chez les Animaux et les Végétaux.



Chapitre 14

DE LA CELLULE À L'ORGANISME. La différenciation cellulaire

Comme on l'a vu dans le chapitre 2, la quasi-totalité des Procaryotes vit à l'état unicellulaire alors que la plupart des Eucaryotes sont des organismes pluricellulaires. La pluricellularité permet l'acquisition d'une taille importante, mais elle s'accompagne nécessairement de l'organisation des êtres vivants en tissus et organes spécialisés destinés à accomplir des fonctions multiples, dont l'évolution montre qu'elles conduisent à une indépendance de plus en plus grande vis-à-vis du milieu. Les Eucaryotes unicellulaires (ou Protistes) sont en général des êtres autonomes chez qui toutes les fonctions vitales, remplies chez un organisme complexe par des appareils diversifiés, sont assurées au sein d'une cellule unique dont la complexité morphologique et structurale est souvent considérable. La taille de certains de ces organismes «en miniature» dépasse même celle des plus petits Métazoaires. Les cellules des êtres pluricellulaires les plus complexes présentent au contraire des spécialisations dans le sens de la réalisation d'une fonction unique, ou d'un nombre limité de fonctions. Celles-ci sont en général acquises au prix de l'hypertophie d'un seul type de structure ou d'organite, et donc de la perte d'une certaine plurifonctionnalité.

Au cours de l'évolution, le passage de l'état unicellulaire à l'état pluricellulaire s'est accompagné, chez les Eucaryotes, de l'acquisition de deux caractéristiques fondamentales, qui sont aussi celles que l'on doit envisager lorsqu'on décrit le développement d'un organisme à partir de la cellule-œuf qui en est à l'origine. La construction de l'individu nécessite à la fois la mise en œuvre d'un programme génétique de différenciation des cellules et d'un programme morphogénétique conduisant à la mise en place de tissus et d'organes, dont le fonctionnement doit être soigneusement intégré. La réalisation de ce double programme implique un accroissement et une complexification importants du contenu de l'information génétique des êtres pluricellulaires (voir chapitre 4).

La pluricellularité s'accompagne aussi de la réalisation de structures appelées matrices extracellulaires, c'est-à-dire un milieu réunissant les cellules, et sécrété par elles ; de ce point de vue, la stratégie évolutive a été fondamentalement divergente chez les Animaux et chez les Végétaux. Dans le cas des Métazoaires, la complexification des organismes s'est accompagnée de la mise en place de relations de plus en plus précises entre les cellules, qui assurent non seulement leur cohésion au sein des tissus, mais aussi et surtout la coordination de leurs fonctions au cours du développement ou de la vie adulte. L'objet de ce chapitre est la caractérisation de l'état différencié, au niveau cellulaire et moléculaire, ainsi que l'étude des différents dispositifs permettant aux cellules d'entrer en contact direct ou indirect avec leurs congénères au sein de l'organisme. Tout ce qui relève spécifiquement du développement embryonnaire et de l'organogenèse ne sera pas traité ici, de même que les problèmes relatifs à la signalisation hormonale, qui seront seulement évoqués.

1. NOTION DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

1.1. Des unicellulaires aux pluricellulaires. Les sociétés de cellules primitives

Entre les Protistes et les organismes pluricellulaires complexes, on trouve dans la nature des êtres dont le degré d'organisation est intermédiaire. Ces derniers, de construction simple, et dont le nombre de cellules différentes est parfois

très limité ne sont sans doute pas, il faut le préciser tout de suite, de réels intermédiaires évolutifs. Par analogie, cependant, ils nous éclairent sur ce qu'ont pu être ces intermédiaires au cours des temps géologiques et sur les mécanismes de complexification progressive qui ont été responsables de leur évolution vers les pluricellulaires modernes.

1.1.1. Chez les Animaux

Les **Spongiaires** sont considérés comme les plus simples des Métazoaires actuels ; leur organisation générale repose sur l'existence de deux feuillets de cellules séparés par un espace amorphe, gélatineux, dans lequel se déplacent quelques cellules isolées. Seuls six à sept types cellulaires distincts contribuent à former le corps de ces organismes qui sont dépourvus d'organes spécialisés et d'appareils définis. Leur structure tissulaire est simple et identique en tout point du corps ; il n'existe pas de système nerveux car il n'est pas nécessaire de coordonner des activités qui seraient différentes d'un endroit à l'autre de l'organisme.

Malgré cette simplicité, une telle organisation doit pouvoir être créée et maintenue. Une des bases de ce maintien est mise en évidence par l'expérience suivante (Wilson, 1907) : lorsque des Éponges sont dissociées mécaniquement ou chimiquement en cellules séparées (par simple pressage et passage à travers un fin tamis, ou par l'élimination des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} de l'eau de mer) on observe que les cellules isolées se réagrègent spontanément et se réassocient par catégories pour former un nouvel organisme en miniature qui redonnera une Éponge normale. Ce phénomène présente une spécificité d'espèce car si on mélange des cellules dissociées issues d'espèces différentes, la réagrégation s'accompagne d'une ségrégation cellulaire, de sorte que les ensembles qui se reforment ne contiennent que des cellules d'un seul type et on réobtient ainsi les deux espèces initiales. Les cellules d'organismes primitifs ont donc, non seulement la capacité de se reconnaître, mais aussi celle de s'associer de façon stable. Le support physique de ces processus est un complexe macromoléculaire glycoprotéique extracellulaire de très haut poids moléculaire, nommé **facteur d'agrégation**, qui nécessite les ions Ca^{2+} pour être actif. Celui-ci se lie d'une part aux cellules grâce à un récepteur de la surface cellulaire et, d'autre part, il forme avec lui-même des agrégats permettant d'accrocher les cellules les unes aux autres.

Les **Cnidaires** sont, comme les Éponges, des organismes diploblastiques, mais leur degré de complexité est sensiblement plus élevé. Leurs deux feuillets contiennent une plus grande diversité de cellules (une dizaine) ; leur forme est bien définie et présente une symétrie axiale. Des compartiments protégés s'individualisent grâce à des jonctions intercellulaires (voir plus loin) qui permettent un contrôle des concentrations locales en ions. Des organes apparaissent (tentacules, cavité digestive), un système nerveux et sensoriel rudimentaires sont mis en place et des cellules myoépithéliales assurent la contraction ; une capacité de réponse et une certaine motilité existent. Chez ces organismes simples, il existe toutefois une spécialisation cellulaire nette, une coopération et une communication entre cellules et enfin une coordination des activités vitales. Toutes les caractéristiques que l'on retrouve actuellement chez les Animaux les plus complexes sont déjà en place.

1.1.2. Chez les Algues et les Végétaux

Dans le monde végétal, on connaît aussi des organismes pluricellulaires simples dont le mode d'organisation permet d'imaginer ce qu'ont pu être d'éventuels intermédiaires évolutifs assurant une transition entre l'état unicellulaire et l'état pluricellulaire. Certains représentants actuels de ces groupes appartiennent manifestement à des voies qui ont avorté, mais leur existence démontre qu'ils ont résolu avec succès au moins quelques uns des problèmes posés par le changement d'état en question. De nombreux exemples de colonies existent chez les Algues ; elles résultent de la non-séparation des cellules après division d'une seule cellule-mère. Il s'en suit la production d'ensembles plus ou moins complexes, selon les espèces, de 2, 4, 8, 16 ou 32 cellules ayant la même forme et les mêmes potentialités. Il n'y a pas, dans ce cas, de spécialisation particulière et de répartition des tâches entre les cellules au sein de l'édifice ; nous sommes encore très proches de ce qui est observé chez les Bactéries coloniales.

Il existe en revanche, chez les Algues vertes, un exemple remarquable de différenciation au sein d'édifices multicellulaires mobiles nommés **cénobes**. Une série d'organismes coloniaux de taille et de complexité structurale croissantes est représentée chez les Volvocales qui rappelle, par certains aspects, un scénario évolutif décrit dans le règne animal.

La série ordonnée des genres : *Gonium, Pandorina*, *Eudorina, Pleodorina* et *Volvox* montre comment on peut passer d'une organisation unicellulaire (semblable à une cellule de *Chlamydomonas*) à un édifice très structuré manifestant une différenciation cellulaire simple mais claire (voir *figure* 14.1).

• Chez les *Gonium* (4 à 32 cellules), les cellules sont identiques, biflagellées et disposées en un plan, leurs flagelles étant tous tournés du même côté.

• Chez les *Pandorina* (4 à 32 cellules), les cellules, toutes identiques, sont disposées en une sphère serrée, les flagelles étant tournés vers l'extérieur.

• Chez les *Eudorina* et *Pleodorina* (16 à 128 cellules), les cellules sont disposées autour d'une sphère creuse remplie d'une substance mucilagineuse. On observe une différenciation en cellules qui se reproduisent, et en cellules plus petites qui ne se reproduisent pas. La proportion de ces dernières augmente à mesure que les genres concernés présentent un nombre de cellules plus élevé. Toutes les cellules communiquent entre elles au moyen de connexions cytoplasmiques équivalentes à des plasmodesmes (voir plus loin).

• Chez les *Volvox* (500 à 60 000 cellules), le même type d'organisation existe mais les tailles sont ici considérables (atteignant le millimètre) et l'édifice est percé d'un pore, installant une polarité au sein de celui-ci. Seules quelques cellules sont réservées à la reproduction et l'on distingue un mode de reproduction végétatif (par production directe de cénobes-fils) ou sexué, faisant intervenir des cellules gamétiques mâles et femelles. Dans les deux cas, un phénomène remarquable a lieu, qui consiste en l'inversion des cénobes juvéniles. Ceux-ci sont en effet produits de sorte que les flagelles de leurs cellules sont tournés vers l'intérieur de la cavité ; après une courte période de multiplication cellulaire (accompagnée d'une diminution de la taille des cellules qui restent confinées dans la paroi de la cellule-mère), le cénobe déjà muni d'un pore se retourne en doigt de gant, exposant ainsi les flagelles à l'extérieur. À partir de ce moment, le cénobe devient mobile et il est libéré après la dissolution des enveloppes qui l'entourent dans la colonie mère. Il faut signaler qu'un retournement de feuillet très semblable est observé au cours du développement des Éponges, mais il s'agit probablement d'une convergence.

Cette voie évolutive n'est pourtant pas celle qui est à l'origine des Végétaux actuels les plus évolués ; c'est une autre stratégie, basée sur la réalisation par les cellules de structures filamenteuses et feuilletées analogues à celles rencontrées chez les Algues modernes, qui a réussi sa «percée». L'analyse comparée de ces divers exemples permet donc de dégager leurs points communs et de définir les conditions minimales exigées pour la construction d'un organisme pluricellulaire animal :

– prolifération cellulaire (avec parfois synchronisme des divisions) ;

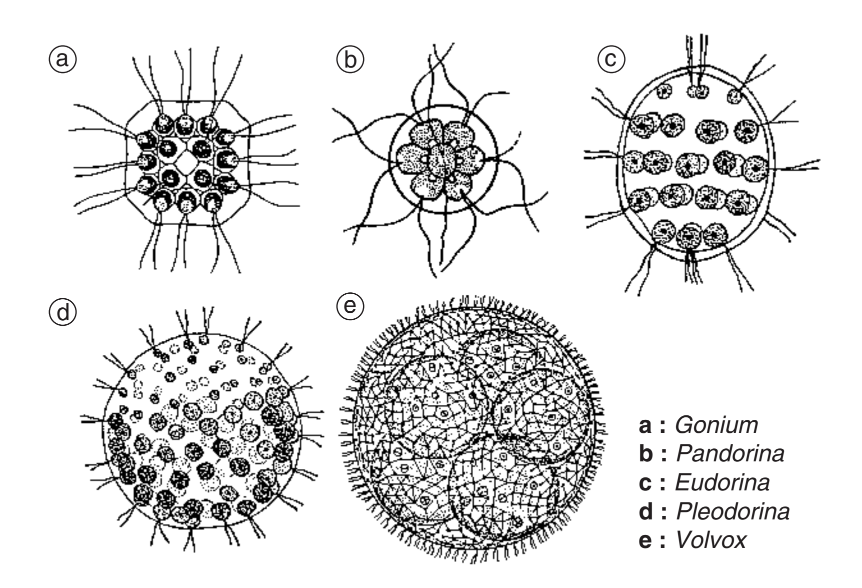


Figure 14.1

Série des Volvocales montrant le passage d'une organisation coloniale simple à un édifice pluricellulaire de grande taille

Les *Volvox* représentent la forme la plus élaborée d'une stratégie évolutive ayant conduit à différencier plusieurs types cellulaires au sein d'un ensemble hautement structuré qui est un véritable organisme. On y trouve les principaux éléments qui caractérisent les êtres pluricellulaires complexes : **1)** spécialisation structurale et fonctionnelle de diverses cellules ; **2)** mise en place d'organes et coordination des fonctions grâce à des échanges entre cellules ; **3)** individualisation d'une lignée germinale.

– différenciation cellulaire (souvent à la suite de divisions inégales ; voir chapitre 12) ;
– réalisation de feuillets et repliement éventuel ;
– communication et échanges entre cellules ;
– reconnaissance entre cellules et mise en place d'organes ;
– mouvements et déplacements de cellules ;
– mise en place d'une matrice extracellulaire intervenant comme lieu d'accrochage, de confinement ou de détermination d'un devenir cellulaire.

1.2. L'état différencié ; quelques exemples

Dans les chapitres précédents, nous avons étudié les fonctions générales des cellules, leurs caractéristiques fondamentales et communes. Bien qu'ayant choisi des exemples aussi diversifiés que possible dans le monde animal ou végétal, nous n'avons pas envisagé les choses sous l'angle spécifique d'une spécialisation cellulaire permettant d'assurer une fonction précise au sein d'un tissu ou d'un organe. La différenciation peut se définir à divers niveaux, depuis l'échelle morphologique et structurale jusqu'à l'échelle moléculaire.

1.2.1. Différenciation morphologique et structurale

La notion de différenciation cellulaire découle du simple examen anatomique des organismes pluricellulaires ; même chez les plus simples d'entre eux, on distingue cytologiquement différents types de cellules. Il n'y a pas d'intermédiaires, en général, entre ces types cellulaires, qui sont nettement marqués ; l'état différencié est donc une situation clairement discontinue. Chez un être humain adulte, par exemple, une étude cytologique complète montre que l'on peut recenser plus de 200 types de cellules, et l'on en compte environ 20 chez les Végétaux supérieurs. Si l'on prenait en compte des propriétés susceptibles d'être mises en évidence par des tests biochimiques ou pharmacologiques, un nombre encore plus important serait obtenu. Il est en effet aisé de faire la différence entre des cellules nerveuses, musculaires ou sécrétrices, mais il est infiniment plus délicat de différencier certains types de cellules nerveuses ou certains types de cellules sanguines entre elles. De même, il est sûr que des cellules peu spécialisées et pluripotentes comme des fibroblastes, comptent diverses catégories génétiquement différenciées, car susceptibles d'induire des réponses différentes de la part d'autres cellules.

1.2.2. Différenciation biochimique et physiologique

Au plan structural, la différenciation consiste la plupart du temps en l'exacerbation du développement d'un type particulier d'organite ; ceci se traduit évidemment par la présence en abondance de molécules spécifiques. Les techniques de la biochimie montrent que les différents types cellulaires d'un organisme donné ne contiennent pas les mêmes espèces moléculaires, les mêmes enzymes, et ne remplissent pas les mêmes fonctions métaboliques. Chez les Vertébrés supérieurs, par exemple, seuls les hépatocytes, les cellules musculaires et rénales, contiennent en quantité importante du glycogène ; seuls les adipocytes accumulent des triglycérides ; seules les cellules nerveuses contiennent en abondance des galactocérébrosides ou des gangliosides. En ce qui concerne la synthèse préférentielle de protéines, on rappelle les exemples classiques de l'hémoglobine chez les hématies, de l'albumine chez les hépatocytes, de la kératine chez les cellules épidermiques. Quant aux voies métaboliques, elles reflètent directement des spécialisations fonctionnelles ; le cycle de l'urée, par exemple, ne se rencontre que dans le foie des Mammifères, et la néoglucogenèse est également spécifique de cet organe. Chez les Végétaux, la photosynthèse n'a lieu que dans les cellules chlorophylliennes et l'accumulation durable de l'amidon au sein des amyloplastes, dans certains organes de réserve (voir chapitres 7 et 10).

Une approche directe permettant de visualiser la diversité des protéines dans des types cellulaires distincts consiste à les séparer par électrophorèse. On considère que toute cellule eucaryotique renferme de 5 000 à 20 000 chaînes polypeptidiques différentes ; afin de les séparer efficacement, l'électrophorèse bidimensionnelle doit être mise en œuvre. Les gels les plus résolutifs montrent 1 000 à 1 500 taches, correspondant aux protéines les plus abondantes. La comparaison des profils obtenus à partir de cellules différentes est en général assez décevante : en dehors de quelques protéines majoritaires caractéristiques (**marqueurs de différenciation**), la plupart des protéines sont communes à toutes les cellules (**protéines ubiquistes**). Cette observation n'est, somme toute, pas très étonnante car beaucoup d'enzymes et de protéines structurales interviennent dans des métabolismes ou des structures universellement répandus : métabolisme énergétique et intermédiaire, machinerie de synthèse des macromolécules, réseaux cytosque-

lettiques ou systèmes membranaires internes. L'analyse moléculaire suggère que chaque type cellulaire possède au plus quelques centaines de protéines lui conférant son identité propre.

Un exemple de différenciation subtile est fournie par l'existence des variations dites **isoenzymatiques** au sein des tissus. La combinaison des approches électrophorétique et enzymatique permet de mettre en évidence, pour une activité enzymatique donnée, une grande diversité de formes moléculaires spécifiques des tissus, chez l'individu adulte, et spécifiques d'un stade de développement, pour un tissu donné. L'étude classique, déjà ancienne, de la **lactico-déshydrogénase** chez la souris, est présentée dans l'encart suivant.

Des résultats semblables ont été obtenus pour de nombreuses protéines, enzymatiques ou pas ; c'est le cas bien connu des diverses catégories d'hémoglobines chez l'Homme ou des cristallines (protéines du cristallin) chez un Amphibien. Ces exemples démontrent que la différenciation biochimique n'est pas seulement une question d'activation ou d'extinction de panoplies de gènes donnés, mais qu'elle est aussi l'effet de régulations quantitatives fines de leur expression.

1.2.3. Différenciation moléculaire

La diversité qualitative et quantitative des collections de protéines dans les cellules différenciées trouve en grande partie son origine dans celle des ARNm produits dans leur noyau. Sauf cas exceptionnels, la séparation des ARNm par électrophorèse ne permet pas de visualiser cette diversité, en raison de leur faible abondance individuelle et de leur nombre très élevé (voir *figure* 8.16). Les cas particuliers concernent quelques types cellulaires spécialisés fabriquant une protéine majoritaire ; on rappelle les exemples classiques des cellules précurseurs des globules rouges, qui synthétisent l'hémoglobine, ou les cellules de l'oviducte de poule, qui synthétisent l'ovalbumine. Dans ces types de cellules, une seule catégorie d'ARNm représente près de 50 % des ARNm totaux, et il devient alors possible de la purifier aisément sur un gradient de saccharose.

La méthode générale mise au point pour mesurer la quantité d'un ARN spécifique implique que l'on ait isolé l'ADN du gène correspondant, dont on peut étudier ainsi l'expression. Les techniques de la biologie moléculaire permettent de préparer des ADN à partir des diverses séquences d'ARNm produits par les cellules, puis de les cloner dans des plasmides (voir chapitre 15). Ces ADN clonés individuels, dont la signification génétique n'est pas nécessairement connue au départ, servent de **sonde** (voir chapitre 3) et sont testés par hybridation vis-à-vis d'ARNm totaux obtenus à partir de différents types cellulaires, selon le protocole suivant. Si l'on marque *in vivo* tout l'ARN cellulaire, dans un tissu particulier que l'on a incubé en présence d'uridine radioactive, par exemple, et si l'on réalise l'hybridation de cet ARN total avec un excès de l'ADN utilisé comme sonde (préalablement dénaturé), on obtient des molécules hybrides dont la quantité reflète directement celle de l'ARN étudié. La séparation de ces hybrides de toutes les

Commentaire

Variabilité tissulaire de la lactico-déshydrogénase chez la souris

Cette enzyme oligomérique est constituée de quatre sous-unités individuellement inactives du point de vue enzymatique, organisées en un complexe actif d'une masse moléculaire de 140 kDa. Les sous-unités sont les produits de deux gènes distincts légèrement différents (A et B), qui existent dans le génome de la souris. Les deux types de chaînes polypeptidiques obtenues peuvent s'associer aléatoirement au sein du hyaloplasme pour former le tétramère, en fonction de leurs quantités relatives. Si un seul gène est actif (A ou B), on obtiendra un type unique de tétramère ; comme on sait distinguer les deux sortes de tétramères (4xA ou 4xB) par électrophorèse (dans des conditions non dénaturantes), on peut savoir quel gène s'exprime dans un tissu donné. Si les deux gènes sont activés au sein de la même cellule, on obtient des combinaisons des sous-unités A et B dont l'abondance relative traduit l'abondance des deux sortes de chaînes, c'est-à-dire, en fait, l'activité des deux gènes ; il existe cinq combinaisons : A_4, B_4, A_3B, A_2B_2, AB_3 que l'on repère très bien sur les gels. La *figure* 14.2 montre l'extrême diversité des profils obtenus dans différents tissus adultes de souris et elle montre aussi que ces profils se modifient considérablement au cours du développement embryonnaire.

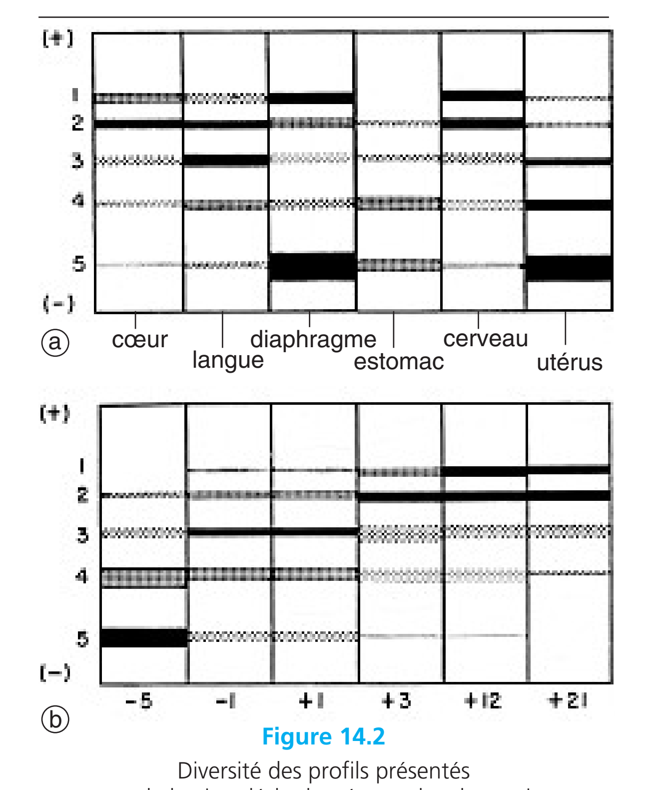


Figure 14.2

Diversité des profils présentés par la lactico-déshydrogénase chez la souris

(a) Isozymes observés dans différents tissus de l'adulte. **(b)** Isozymes observés au cours du développement embryonnaire et post-natal dans le rein.

autres molécules restées simple-brin est possible, et l'on peut ainsi mesurer leur radioactivité.

1.3. Acquisition de l'état différencié. De l'œuf à l'organisme

La diversification des types cellulaires au cours du développement embryonnaire est évidemment progressive ; l'acquisition de l'état différencié se réalise dans des cellules qui, sauf exception, ont toutes la même information génétique, puisqu'elles dérivent les unes des autres par mitose. La question est donc de savoir comment, au cours du développement, des cellules peuvent utiliser un même stock de gènes pour parvenir à un résultat visiblement différent. Ce type de problématique dépasse largement le cadre d'un ouvrage de biologie cellulaire et relève plutôt d'un cours de biologie du développement. On se contentera ici de signaler deux types de processus fondamentaux évoqués par les embryologistes pour rendre compte de la construction d'un organisme pluricellulaire complexe à partir d'une cellule unique.

Le premier repose sur une **hétérogénéité cytoplasmique** initiale de l'œuf. Au cours de la segmentation, les différents blastomères héritent de constituants biochimiques spécifiques, en fonction de leur origine ; ces derniers influencent directement l'expression des gènes et donc le devenir des cellules qui en descendent. Les mécanismes élémentaires de régulation de l'expression des gènes, qui sont à la base de ces phénomènes, ont été présentés dans les chapitres 4 et 8. Ce type de déterminisme est facile à comprendre, et il a été démontré expérimentalement dans le cas des œufs de grande taille et de structure complexe et polarisée tels ceux des Amphibiens ou des Insectes. Le second mécanisme est basé sur l'existence d'interactions entre cellules proches au sein de l'embryon. Certaines cellules, sous l'action de facteurs au départ parfois difficilement identifiables, émettent des signaux chimiques qui sont perçus par des cellules voisines, le plus souvent grâce à des récepteurs de surface (voir la notion de transduction du signal, dans le chapitre 13). Ceci se traduit par l'engagement des cellules sensibles dans une voie de différenciation particulière, à la suite de la stimulation de l'expression d'une panoplie spécifique de leurs gènes. Ce mécanisme, appelé **induction embryonnaire**, agit souvent en cascades et est à l'origine de réseaux d'interactions cellulaires complexes.

Ces deux types de processus, qui ne sont pas exclusifs, impliquent une plus ou moins grande autonomie de développement des cellules embryonnaires. Ils peuvent être identifiés, et leur importance relative évaluée, de même que la rigueur de l'engagement qu'ils imposent à la cellule, par les méthodes de l'embryologie expérimentale : isolement et culture de cellules embryonnaires, destruction de territoires de l'œuf, ablations ou greffes de fragments d'embryons plus ou moins âgés… Dans tous les cas, on constate que les cellules qui ont une évolution identique contractent précocément des liens physiques étroits (jonctions d'ancrage et jonctions communicantes ; voir plus loin) intervenant dans la coordination de leur devenir et de leurs fonctions.

Une conclusion qui découle de toutes ces analyses est la notion de **détermination cellulaire**. On dit qu'une cellule est déterminée quand elle est engagée de façon définitive dans un programme de différenciation donné, bien qu'elle ne manifeste pas encore les caractéristiques visibles de celle-ci, seulement acquises pendant la phase finale dite de

différenciation terminale. Au plan génétique, ceci traduit une restriction des potentialités d'expression de son matériel héréditaire ; on peut ainsi démontrer qu'au sein d'un embryon, des cellules ayant le même aspect, apparement identiques, sont déjà orientées dans des voies différentes. Un exemple classique est constitué par les disques imaginaux trouvés dans les larves de certains Insectes. Chez les Animaux adultes, il existe aussi des cellules qui sont typiquement non différenciées mais déterminées ; il s'agit des **cellules-souches** qui conservent une aptitude à se diviser et sont à l'origine de cellules s'engageant dans une spécialisation morphologique et fonctionnelle marquées (voir plus loin et chapitre 13).

1.4. Caractéristiques de l'état différencié et de l'état déterminé

1.4.1. Transmissibilité du caractère différencié à travers la division cellulaire

On connaît, aussi bien chez les Animaux que chez les Végétaux, des types cellulaires différenciés qui conservent la possibilité de se diviser. Ces cellules manifestent suffisamment de plasticité, au plan structural, pour pouvoir assurer la mitose et produire des cellules semblables : on peut citer les cellules hépatiques, les cellules pancréatiques ou les cellules endothéliales. Si on cultive *in vitro* des cellules pigmentaires de rétine embryonnaire de poulet, caractérisées par leur aptitude à fabriquer de la mélanine, elles prolifèrent sans problème ; elles peuvent être repiquées pendant de nombreuses générations tout en conservant leur phénotype différencié. De même, de nombreuses lignées de cellules cancéreuses sont caractérisées à la fois par une prolifération indéfinie *in vitro* et l'expression de traits de différenciation typiques des tissus sains dont elles dérivent :

- des cellules d'**hépatome** (cancer du foie) continuent à exprimer de façon stable un large spectre de fonctions hépatiques : fabrication d'albumine, synthèse d'enzymes spécifiques, telles que l'alcool déshydrogénase… ;
- des cellules de **myélome**, dérivant de plasmocytes sécréteurs d'anticorps, produisent un seul type de ces molécules ;
- des cellules de **mélanome**, dérivant de cellules pigmentaires de la peau, continuent à fabriquer de la mélanine, ce qui permet de les identifier.

Il existe des cas où la différenciation s'accompagne d'une impossibilité absolue de se multiplier en raison de la perte du noyau ; on peut rappeler les exemples des hématies de Mammifères, condamnées à mourir phagocytées après une vie de 100 à 120 jours, ou des cellules du cristallin qui persistent durant toute la vie de l'individu. Chez les Végétaux, les cellules des tubes criblés survivent longtemps sans noyau, tout en accomplissant leur fonction de transport de la sève élaborée, alors que les cellules du bois doivent mourir, dans le cadre de leur programme de différenciation. Il faut enfin remarquer que l'état déterminé est tout autant perpétué à travers la division que l'état différencié, comme l'attestent les exemples cités plus haut des disques imaginaux des Insectes ou des cellules souches des Vertébrés (voir chapitre 13).

1.4.2. Irréversibilité de la différenciation chez la plupart des cellules des animaux supérieurs

L'acquisition de structures cellulaires très spécialisées s'accompagne en général d'une impossibilité de division et de retour vers un état moins différencié. C'est le cas des cellules musculaires striées, des cellules superficielles de l'épiderme, de la plupart des cellules nerveuses qui sont, soit encombrées, au sein de leur hyaloplasme, par des structures moléculaires impossibles à résorber (myofibrilles d'actine et de myosine, fibres de kératine), soit ont acquis une morphologie et une organisation générales difficilement compatibles avec une dédifférenciation. C'est aussi le cas de certaines cellules sécrétrices, qui meurent au cours du processus de relargage de leur contenu dans le milieu. Ce caractère irréversible est parfois lié, comme on l'a signalé plus haut, à la perte du noyau.

Quelques exceptions à cette règle existent : il s'agit des cas de **transdétermination** et de **transdifférenciation**. Le premier phénomène a été démontré expérimentalement chez la drosophile, au moyen de greffes successives de disques imaginaux dans des larves. Ces tissus à caractère embryonnaire, dont la détermination est connue, peuvent ainsi être repiqués *in vivo* un très grand nombre de fois et multipliés sans changer de programme génétique ; cependant il arrive parfois que cette détermination change et que de telles cellules de disque imaginal donnent naissance chez l'adulte à un tout autre organe que celui auquel on se serait attendu normalement. La transdifférenciation est

un phénomène exceptionnel mis en évidence chez certains Amphibiens ; il est défini par un changement de spécialisation cellulaire après un bref passage par une dédifférenciation. Il a été montré chez le Triton, dans une situation de régénération de l'œil après ablation, que des cellules de rétine neurale ou de cristallin peuvent être formées à partir de cellules pigmentaires dédifférenciées.

On doit aussi citer un phénomène intéressant, qui sera rappelé plus loin, concernant les **chondroblastes** ou les **ostéoblastes** ; lorsque ces cellules sont isolées de leur milieu d'origine, elles perdent rapidement *in vitro* leur organisation et leurs structures caractéristiques, cessent leurs sécrétions spécifiques, reprennent un phénotype fibroblastique peu différencié et se remettent à se diviser.

1.4.3. Réversibilité de la différenciation et totipotence chez les Végétaux et certains Animaux inférieurs

Dans diverses conditions, naturelles ou artificielles, des cellules différenciées d'un végétal adulte peuvent se différencier en un autre type cellulaire. Des cellules parenchymateuses du cortex peuvent être amenées, à la suite de blessures endommageant les faisceaux conducteurs, à se diviser puis à se redifférencier pour régénérer des éléments de xylème et de phloème, afin de restaurer la continuité de la vascularisation. Des tissus variés de nombreuses plantes sont capables, après mise en culture, de perdre leur spécialisation fonctionnelle initiale et leurs caractères morphologiques, et de conduire à la production de cals formés de cellules indifférenciées (voir *figure* 3.14). À partir de ces derniers, il est possible de régénérer une plante entière par **organogenèse *in vitro*** (voir *figure* 14.3). De façon un peu différente, on a montré chez plusieurs plantes (carotte, pétunia, tabac, pomme de terre, etc.) qu'une seule cellule somatique provenant d'un cal ou d'une culture de cellules, un protoplaste issu d'une cellule différenciée, un grain de pollen, pouvaient donner naissance directement à un embryon dont l'évolution, semblable à celle d'un embryon issu de fécondation, conduisait à une plante entière ; c'est **l'embryogenèse somatique**.

Toutes ces observations prouvent que les cellules des plantes supérieures conservent une totipotentialité qui, en dehors de la lignée germinale, n'a pas d'équivalent dans le règne animal, à l'exception des groupes les plus inférieurs, dont l'organisation reste simple. L'hydre d'eau douce, par exemple, a en effet conservé la possibilité de régénérer un organisme complet à partir de presque tous les types cellulaires dont elle est constituée (après dédifférenciation). Chez les Planaires, il existe des cellules somatiques totipotentes : les néoblastes, qui interviennent dans des processus de **régénération** de grande ampleur, survenant après amputation de telle ou telle partie du corps. De nombreux Invertébrés, y compris des Arthropodes, et certains Vertébrés inférieurs, gardent une capacité limitée de régénération des membres : pattes chez la blatte, membres chez les Urodèles, queue du lézard, etc.

Il ressort clairement de tout ceci que la différenciation n'a pas atteint le même degré de complexification dans le règne animal et dans le règne végétal, et que corrélativement, la perte de la pluripotentialité ou de la totipotentialité sont le prix à payer pour cette complexification. De plus, l'observation de cette différenciation chez les Animaux conduit à faire une remarque importante : la spécialisation cellulaire s'accompagne la plupart du temps de la perte de diverses fonctions que l'on attribue généralement à toute cellule, telles que la capacité de se nourrir de façon autonome, celle de se reproduire ou de se déplacer. Les cellules appartenant à un organisme complexe ne répondent donc plus à la définition classique : cellule = plus petite unité de vie indépendante. Elles sont au contraire devenues totalement dépendantes du reste de l'organisme qui constitue un milieu protégé, aux caractéristiques physicochimiques constantes. L'état différencié constitue sans doute un avantage à l'échelle de l'organisme, mais il conduit inévitablement à une fragilisation de la cellule en tant qu'entité ; il est indissociable des notions d'altruisme cellulaire et d'**homéostasie** et d'une certaine manière aussi, il est indissociable de la notion de mort.

2. RELATIONS DIRECTES ENTRE LES CELLULES AU SEIN DE L'ORGANISME

Au sein des organismes pluricellulaires, les cellules appartenant à la plupart des tissus contractent des liens directs les unes avec les autres. Chez

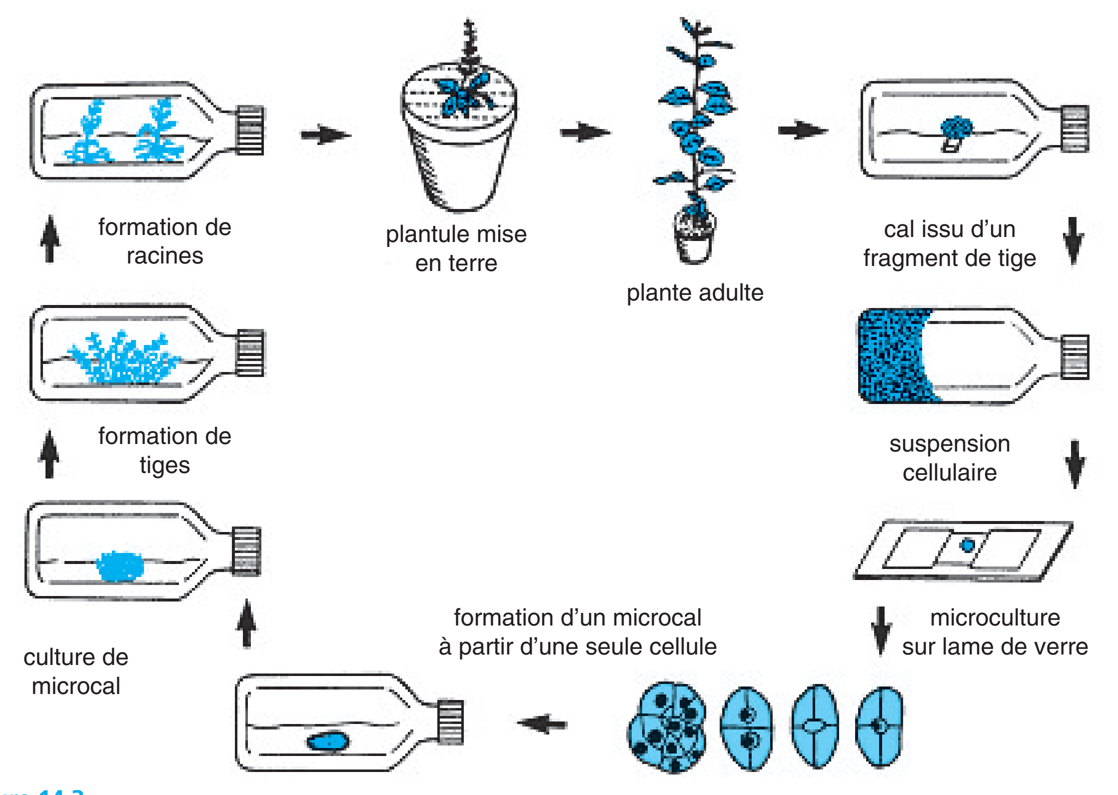


Figure 14.3
Démonstration de la totipotence des cellules chez les Végétaux supérieurs
En manipulant de manière appropriée les facteurs de croissance (hormones végétales) inclus dans divers milieux de culture successifs, on peut régénérer une plante entière à partir de cals obtenus *in vitro*. Certaines hormones favorisent la production de tiges feuillées (cytokinines), tandis que d'autres provoquent l'apparition des racines (auxines) ; (d'après N. Maclean).

les Animaux, ceci est réalisé au moyen de divers dispositifs membranaires nommés **jonctions intercellulaires**, ainsi que grâce à des **protéines** dites **d'adhérence**. Cette observation est particulièrement vraie pour les cellules organisées en épithéliums, c'est-à-dire en feuillets constitués de une ou plusieurs couches superposées de cellules jointives et étroitement associées entre elles. Les jonctions intercellulaires mettent en contact direct les membranes plasmiques des cellules voisines, et il n'existe pratiquement aucun espace entre elles. Nous verrons aussi que les cellules animales appartenant à un même tissu contractent des liens physiques plus subtils, qui ne se traduisent pas par des structures visibles au microscope. Les mécanismes mis en œuvre permettent cependant aux cellules de se reconnaître et de s'associer spécifiquement (voir paragraphe 1.1.1.). On parle d'**adhérence cellulaire** pour désigner ce phénomène qui assure une certaine cohésion aux tissus adultes mais joue surtout un rôle très important lors du développement embryonnaire.

La situation est complètement différente dans le monde végétal où chaque cellule est recouverte d'une paroi rigide plus ou moins épaisse, de nature essentiellement polysaccharidique (exosquelette) ; il n'y a donc pas de contact direct de grande ampleur entre deux cellules voisines, comme c'est le cas chez les Animaux. Cette paroi, qui a la signification d'une matrice extracellulaire (voir plus loin), est en fait à la base de toutes les différences fondamentales permettant de distinguer le règne animal et le règne végétal, qu'il s'agisse de la morphologie, de la nutrition, de la croissance ou de la reproduction. Bien que la paroi soude littéralement les cellules les unes aux autres, elle ne les isole pas de façon absolue et n'empêche pas les échanges ou les possibilités d'interaction entre elles. Chaque cellule communique en effet avec ses voisines au moyen d'une multitude de

canaux cytoplasmiques microscopiques appelés **plasmodesmes**, grâce auxquels diverses molécules (nutriments ou signaux chimiques) indispensables à la vie de l'organisme sont échangées.

2.1. Dispositifs d'accrochage entre cellules animales : jonctions d'ancrage et jonctions étanches

Les épithéliums constituent des tissus de protection et servent de frontière vis-à-vis du milieu extérieur (épiderme) ou bien de limite à des cavités naturelles de l'organisme (épithélium bronchique, intestinal, glandulaire). Ils montrent à la fois des propriétés d'imperméabilité, d'élasticité et de résistance mécanique à la tension. Les cellules qui les constituent présentent, au niveau de leurs membranes, des dispositifs d'accrochage particulièrement développés qui leur assurent une grande cohésion. Les jonctions d'ancrage sont de deux types : 1) les **ceintures d'adhérence** (ou desmosomes ceinturants), qui forment, comme dans le cas des entérocytes, une ceinture entourant complètement la cellule et soudée aux ceintures correspondantes des cellules voisines, 2) les **desmosomes ponctuels**, abondants, par exemple, dans les cellules épidermiques et qui soudent également les cellules voisines les unes aux autres, mais à la façon de rivets ou de «boutons-pression».

2.1.1. Ceintures d'adhérence

Elles sont constituées d'un faisceau épais et serré de microfilaments d'actine disposés parallèlement à la membrane plasmique ; elles entourent généralement la cellule dans sa partie apicale, de façon complète (voir *figure* 9.19 et chapitre 11). L'espace intercellulaire situé entre les deux faisceaux des cellules voisines est rempli d'un matériel protéique dense qui est en relation avec les microfilaments par l'intermédiaire de protéines transmembranaires (ovomoruline ; voir plus loin). De cette manière, deux ceintures voisines sont solidement accrochées l'une à l'autre, ce qui solidarise fortement les cellules au sein de l'épithélium.

2.1.2. Desmosomes ponctuels

Ils sont constitués, dans chaque cellule, d'un disque de 0,2 µm de diamètre et de 20 nm d'épaisseur (**plaque cytoplasmique**) vers lequel converge un réseau dense de filaments intermédiaires, qui sont de nature différente selon le type tissulaire : kératine dans les cellules épithéliales (tonofilaments), desmine dans les cellules musculaires cardiaques ou vimentine. Les deux disques qui se font face dans les cellules voisines sont réunis par des glycoprotéines transmembranaires provenant de chacune d'elles (les **cadhérines** ; voir plus loin), et qui interagissent étroitement au niveau d'un espace intercellulaire élargi (voir *figure* 14.4).



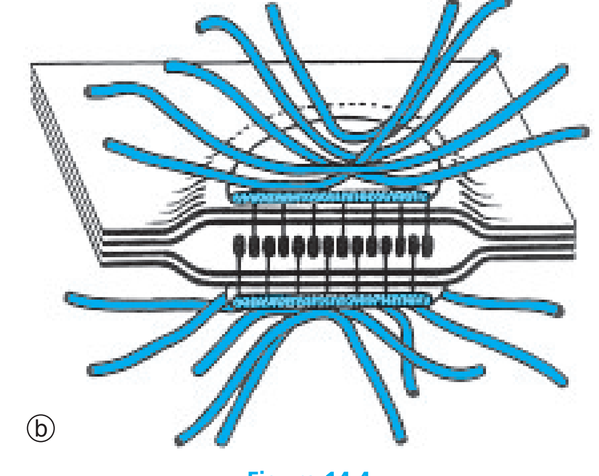


Figure 14.4

Organisation d'un desmosome ponctuel

(a) Cliché obtenu en microscopie électronique ; × 30 000. **(b)** Schéma représentant l'organisation moléculaire d'un desmosome ponctuel. Cliché Labo. BG., Orsay.

Les ceintures d'adhérence et les desmosomes ponctuels sont en relation directe avec le cytosquelette intracellulaire (dont ils partagent certains éléments constitutifs ; voir chapitre 11), et réalisent ainsi un réseau fibreux transcellulaire qui confère une résistance importante aux épithéliums. Deux autres types de jonctions peuvent être observés dans les cellules épithéliales, en particulier les entérocytes et certaines cellules des tubes urinifères : les **hémidesmosomes** et les **jonctions ser-**

rées. Les premiers ont exactement la structure des desmosomes ponctuels mais ils ancrent les cellules épithéliales à la membrane basale sur laquelle celles-ci reposent, et non pas aux cellules voisines (voir paragraphe 3.3.). Deux exemples de maladies génétiques associées à ces structures sont décrits dans l'encart suivant.

ENCART BIOMÉDICAL

Les maladies génétiques des jonctions intercellulaires ou de liaison à la matrice extracellulaire

L'existence de maladies graves, telles que le *pemphigus vulgaris*, témoignent de l'importance du rôle des desmosomes dans l'accrochage des cellules entre elles. Dans cette affection de la peau, les patients souffrent d'une fragilité extrême de l'épiderme qui se traduit par une « fuite » des fluides corporels ; cette perméabilité anormale est à l'origine de multiples cloques ou ampoules, accompagnées d'une destruction progressive de la peau. Il s'agit d'une maladie auto-immune pour laquelle on a montré que l'organisme fabrique des anticorps qui détruisent spécifiquement les nombreux desmosomes chargés de solidariser fortement les kératinocytes (cellules épidermiques), bien visibles en particulier dans la couche dite « des cellules épineuses de Malpighi ». Les cadhérines desmosomales (ou desmogléines), dont les domaines extracellulaires assurent l'accrochage entre les cellules, sont en fait la cible des anticorps, qui suppriment ainsi leurs propriétés de liaison.

De manière différente, on connaît une maladie génétique associée à une anomalie des molécules transmembranaires qui lient le cytosquelette à la matrice extracellulaire : la maladie de Glanzmann. Il s'agit d'une déficience d'un gène codant une protéine de la famille des intégrines se situant spécifiquement dans la membrane plasmique des plaquettes sanguines. Cette intégrine, de type récepteur de la fibronectine, est également capable de fixer le fibrinogène qui a un rôle important dans la coagulation du sang et la formation du « clou plaquettaire » (ou thrombus blanc, dont le rôle est d'obturer rapidement les brèches vasculaires). L'interaction entre les plaquettes et le réseau de fibrine ne pouvant plus s'effectuer, les patients présentent donc de graves anomalies de la coagulation et sont victimes d'hémorragies répétées.

2.1.3. JONCTIONS SERRÉES (OU ÉTANCHES)

Situées dans la zone apicale de la membrane basolatérale, au-dessus de la ceinture d'adhérence, ces jonctions se présentent comme une série de plusieurs rangées plus ou moins parallèles (parfois convergentes) de « points de soudure » rapprochés entre les deux membranes plasmiques, particulièrement visibles en cryodécapage (voir *figure* 14.5). L'accollement entre les membranes est obtenu ici aussi grâce à des protéines transmembranaires entrant en contact étroit les unes avec les autres. Ces jonctions ont deux fonctions : elles empêchent tout d'abord que les fluides et les substances dissoutes contenues dans les cavités naturelles (le tube digestif, par exemple) ne passent directement, entre les cellules, dans le milieu intérieur (ces jonctions sont dites aussi étanches). Ainsi, toute substance contenue dans l'intestin grêle traverse forcément les **entérocytes** pour être absorbée, ce qui permet une sélectivité et une régulation de son transport (voir *figure* 6.14). La deuxième fonction de ces jonctions est d'empêcher la diffusion (par mobilité latérale due à la fluidité membranaire) des protéines de la face apicale (qui porte, entre autres, les microvillosités) vers le domaine basola-



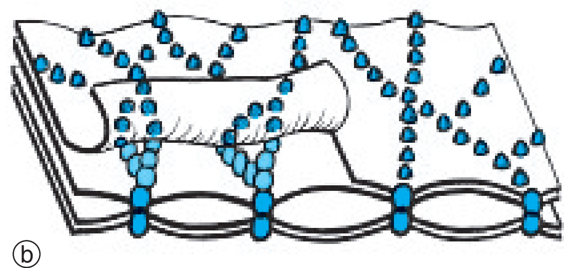


Figure 14.5

Organisation d'une jonction serrée

(a) Cliché obtenu en microscopie électronique (cryodécapage ; × 24 000). **(b)** Schéma représentant l'organisation moléculaire d'une jonction serrée. Au niveau des points de soudure, qui s'étendent sur une hauteur de 0,5 à 1 µm, les deux membranes se touchent littéralement et il n'y a plus d'espace intercellulaire, réalisant ainsi une étanchéité parfaite. Cliché Labo. BG., Orsay.

téral, et inversement. Ceci permet à la cellule de conserver sa polarité structurale, au plan membranaire, et donc une polarité fonctionnelle indispensable pour une cellule absorbante. L'ensemble des jonctions intercellulaires caractéristiques des cellules épithéliales est représenté dans la *figure* 9.19.

À côté de ces dispositifs spécialisés, on peut enfin signaler l'existence d'un type de structure beaucoup plus simple, mais permettant d'assurer également une adhérence forte entre cellules : il s'agit des **interdigitations membranaires**. Ces lames cytoplasmiques contournées et étroitement imbriquées, issues de deux cellules voisines, fonctionnent selon le principe des « tenons et mortaises » ; on les rencontre en abondance dans certains tissus épithéliaux (par exemple, la vessie de grenouille).

2.2. Communication directe entre les cellules

Il faut faire ici une remarque préliminaire relative à une différence importante entre les notions d'organismes chez les Animaux et les Végétaux. En raison du mode de division de leurs cellules et de la manière dont ils se construisent au cours du temps, les seconds peuvent davantage être considérés comme des colonies de cellules plus que des ensembles hautement intégrés de tissus et d'organes distincts, comme c'est le cas chez les Animaux. Toutes les cellules d'une plante communiquent en effet directement entre elles au moyen de vrais ponts cytoplasmiques, les **plasmodesmes**. En revanche, chez les Animaux, les communications directes entre cellules nécessitent en général des dispositifs spécialisés appelés **jonctions communicantes** ; dans quelques rares cas, cependant, on reconnaît chez ces derniers l'existence de continuités directes et importantes entre cytoplasmes de cellules voisines.

2.2.1. Jonctions communicantes

Les cellules animales voisines, dans tous les tissus de la plupart des espèces, sont réunies par des jonctions qui apparaissent, en coupe ultrafine, comme des régions où les membranes adjacentes sont étroitement accolées mais séparées par un espace de 2 à 3 nm, sur une longueur de 50 à 100 nm. Ces jonctions, parfois appelées **jonctions lacunaires**, forment des plaques ou des disques constitués d'une multitude de petits canaux transmembranaires serrés les uns contre les autres, qui font communiquer les cytoplasmes des cellules voisines, d'où leur nom (voir *figure* 14.6). L'organisation moléculaire de ces structures est bien connue. Chaque membrane possède en fait son propre canal transmembranaire, parfois appelé **connexon**, qui se dispose en face d'un canal équivalent dans la cellule voisine. Un canal est constitué de six sous-unités identiques délimitant un

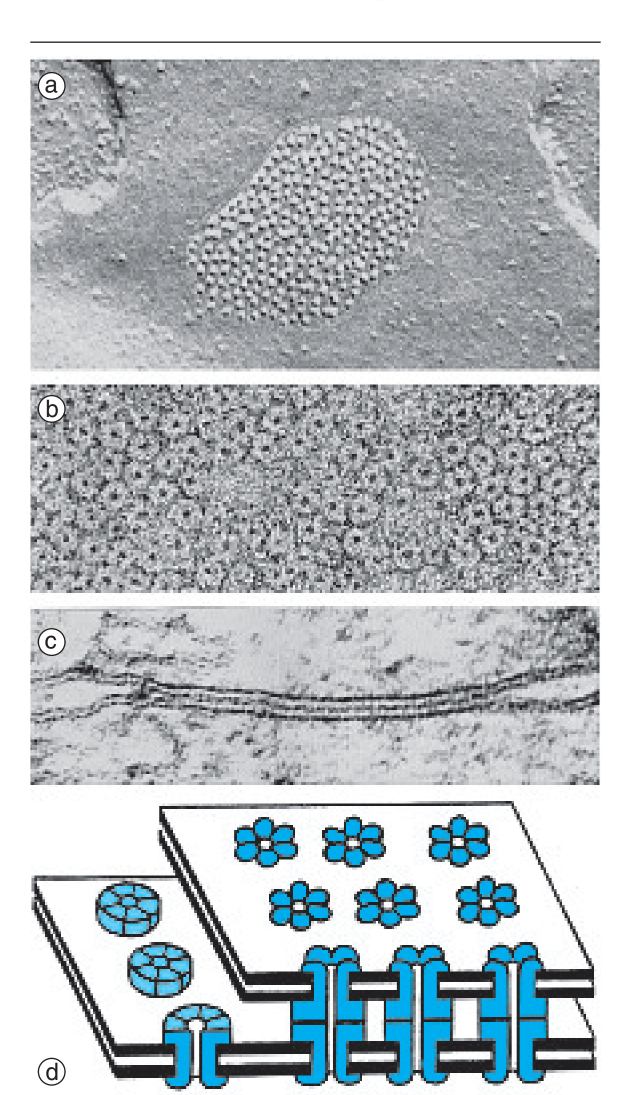


Figure 14.6

Organisation d'une jonction communicante

Clichés obtenus en microscopie électronique : **(a)** cryodécapage (× 85 000) ; **(b)** coloration négative, et **(c)** coupe transversale conventionnelle. **(d)** Schéma présentant l'organisation moléculaire d'une jonction communicante ; celle-ci est formée de la juxtaposition d'un grand nombre de connexons alignés dans les deux membranes cellulaires. Clichés Labo. BG. et BC4, Orsay.

pore central dont le diamètre est de 2 à 3 nm ; chaque sous-unité est formée d'une seule chaîne polypeptidique traversant 4 fois la bicouche phospholipidique. Des centaines ou des milliers de connexons opposés et juxtaposés constituent une jonction communicante ; ils sont aisément visibles grâce à la technique de **cryodécapage**.

L'existence de ces canaux a été soupçonnée avant même qu'on les observe, grâce à des expériences d'électrophysiologie qui démontraient que des cellules voisines étaient le plus souvent électriquement couplées (d'où leur nom de **synapses électriques**). La démonstration directe a été faite en injectant, dans les cellules, des composés (en général, des substances fluorescentes) dont on on pouvait suivre la diffusion dans les cellules voisines. Ces pores laissent passer librement d'une cellule à l'autre des molécules ayant une masse moléculaire allant jusqu'à 1 200 Da ; il s'agit de nutriments (glucose, acides aminés, nucléotides) ou de molécules et d'ions ayant un rôle de médiateur ou de messager intracellulaire (AMP cyclique, ions Ca^{2+}). Les jonctions communicantes permettent donc, non seulement d'assurer une coopération métabolique entre cellules, mais aussi et surtout une coordination des activités ou des réponses à des stimuli tels que les hormones. Une particularité de ces jonctions est que leur perméabilité est régulée, en ce sens que certains facteurs, tels qu'une concentration intracellulaire élevée en ions Ca^{2+}, peuvent conduire à leur fermeture, à la suite d'un changement de conformation des sous-unités constitutives.

Quelques exemples de fonctions associées à ces jonctions peuvent être donnés.

• Les cellules du muscle cardiaque des Vertébrés, celles des muscles lisses, possèdent de nombreuses jonctions de ce type ; en permettant le passage rapide des ions Ca^{2+}, elles assurent la coordination des contractions de toutes les cellules d'une même région du cœur ou du muscle.

• Dans les épithéliums ciliés (bronches, oviducte), le battement coordonné des cils serait également lié à leur présence.

• Chez tous les embryons (à partir du stade «8 cellules» chez la souris, ou au stade blastula chez la grenouille, par exemple), on constate que de nombreuses cellules sont couplées par ces jonctions. Leur rôle est d'assurer de manière coordonnée, au sein d'un massif cellulaire donné, une voie de développement unique par couplage trophique et hormonal. Ceci a été démontré au moyen d'injections, dans ces cellules, d'anticorps anti-connexine (voir plus loin) : le développement embryonnaire s'en trouve alors très perturbé.

2.2.2. Perforations existant entre cellules animales

On connaît quelques exemples de cellules, en particulier dans la lignée germinale, qui communiquent entre elles par de larges orifices. Ces cellules sont en fait «sœurs» et ces orifices représentent des ponts cytoplasmiques persistant après une séparation incomplète lors de la division. Les ovogonies et les spermatogonies, chez les Vertébrés, ainsi que les cellules folliculeuses nourricières chez certains Insectes (drosophile) présentent cette particularité. La coordination des étapes du développement, dans le premier cas, la nécessité de fournir rapidement de réserves à l'ovocyte, dans le deuxième, sont à mettre en rapport avec l'existence de ces dispositifs.

2.2.3. Plasmodesmes

Ces fins canalicules de 30 à 40 nm, typiques des cellules végétales, traversent les parois cellulosopectiques et réunissent deux cellules voisines ; on en compte de 1 à 10 par μm^2 de surface membranaire. À de rares exceptions près, toutes les cellules d'un végétal communiquent entre elles grâce aux plasmodesmes (voir *figure* 14.7). Ces derniers sont

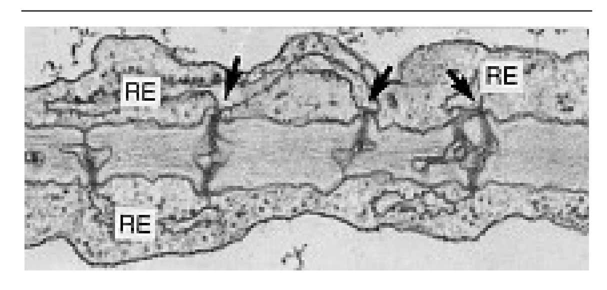


Figure 14.7

Organisation des plasmodesmes chez les Végétaux

À leur niveau, les membranes plasmiques sont en continuité, et ils sont en général traversés par un tubule membranaire (desmotubule) qui est en rapport avec le réticulum endoplasmique (RE) des deux cellules. Les plasmodesmes se forment autour d'éléments du réticulum endoplasmique piégés lors de la formation de la nouvelle paroi qui sépare les deux cellules, lors de la cytodiérèse (voir chapitre 12). La structure du desmotubule semble plus complexe que celle d'une simple membrane car il est étroitement associé à des granules de nature et de fonction inconnue (× 35 000).

le lieu d'échanges importants d'eau, d'ions et de métabolites entre les cellules (en particulier, le saccharose) ; la taille limite des molécules qui diffusent librement est d'environ 1 000 Da. Comme pour les jonctions communicantes, la preuve du transport de cellule à cellule a été apportée par des expériences d'électrophysiologie et d'injection de composés fluorescents. Les plasmodesmes sont aussi le lieu de passage des Virus, lors d'infections ; dans ce cas, il est nécessaire que le canal s'élargisse significativement, mais les mécanismes mis en œuvre restent inconnus. L'ensemble des cytoplasmes cellulaires réunis par les plasmodesmes constitue chez un végétal ce qu'on appelle le **symplasme,** par opposition à l'**apoplasme**, constitué par les parois et les espaces intercellulaires.

2.3. Reconnaissance entre cellules animales : adhérence cellulaire

Nous avons vu que, chez un Animal adulte, les cellules d'un même tissu sont le plus souvent maintenues entre elles par des jonctions intercellulaires spécialisées qui assurent la cohésion de l'ensemble. Au cours du développement embryonnaire, ces tissus se forment de manière progressive à partir de cellules qui sont en général associées de façon provisoirement lâche et qui ne possèdent pas d'emblée tous ces dispositifs d'accrochage. De plus, de très nombreux organes sont mixtes, c'est-à-dire constitués de cellules ayant des origines variées et ayant parfois gagné individuellement leur emplacement définitif à la suite de migrations au sein de l'embryon. La mise en place et la stabilisation de ces ensembles complexes de tissus posent donc la question de la reconnaissance entre des cellules de même origine.

2.3.1. Mise en évidence des propriétés d'adhérence chez les cellules animales

La mise en évidence de ces propriétés passe par des expériences de dissociation *in vitro* de tissus constitués, et l'étude de l'aptitude des cellules isolées à se réassocier (expériences d'agrégation cellulaire semblables à celles décrites plus haut sur les Éponges). Ceci est cependant difficile à partir de tissus adultes où les cellules ont contracté des liaisons très stables au moyen des jonctions spécialisées vues plus haut. En revanche, les tissus embryonnaires sont plus faciles à désorganiser par des traitements doux tels que des protéolyses ménagées à la trypsine ou l'élimination des ions Ca^{2+}. Ces expériences montrent que des cellules dissociées identiques se réassemblent spontanément en massifs compacts et que cette agrégation est spécifique d'un tissu donné (voir l'encart suivant).

Commentaire

Le triage cellulaire

Trois types de tissus embryonnaires précoces sont identifiables au stade neurula chez les Amphibiens : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme ; ils peuvent être aisément séparés par microdissection. On peut ensuite dissocier chimiquement les cellules de ces trois types de tissus, les mélanger intimement et les cultiver ensemble *in vitro*. Au bout d'un certain temps de culture, on observe que les cellules identiques (de même origine) se sont retrouvées, après avoir évidemment accompli des migrations au sein de l'agrégat initial. De plus, elles se disposent de façon à reconstituer un édifice où les tissus sont à la place attendue ; on parle de **triage cellulaire** (voir *figure* 14.8). De la même façon, mais sur des embryons plus âgés d'oiseau, on a montré que si des cellules embryonnaires dissociées provenant de deux tissus différents : foie et rein, ou bien foie et rétine, sont initialement mélangées, il s'opère rapidement un tri au sein des agrégats et une reconstitution de massifs homogènes. Quand des cellules de deux espèces différentes (mais voisines) sont mélangées, elles ignorent en général les différences d'espèces et se reconnaissent d'abord par leur origine tissulaire pour former des agrégats tissus-spécifiques mixtes ; ceci démontre la force du lien qui existe dans ces phénomènes d'adhérence cellulaire.

À partir de ces observations, des tests *in vitro* d'adhérence très sensibles, utilisant des cellules dissociées vivantes radiomarquées (ou marquées par des fluorochromes) ont été mis au point. Ces tests quantitatifs ont ouvert la voie à l'identification des protéines d'adhérence.

2.3.2. Identification des protéines d'adhérence

La stratégie privilégiée pour identifier les protéines membranaires responsables des phénomènes

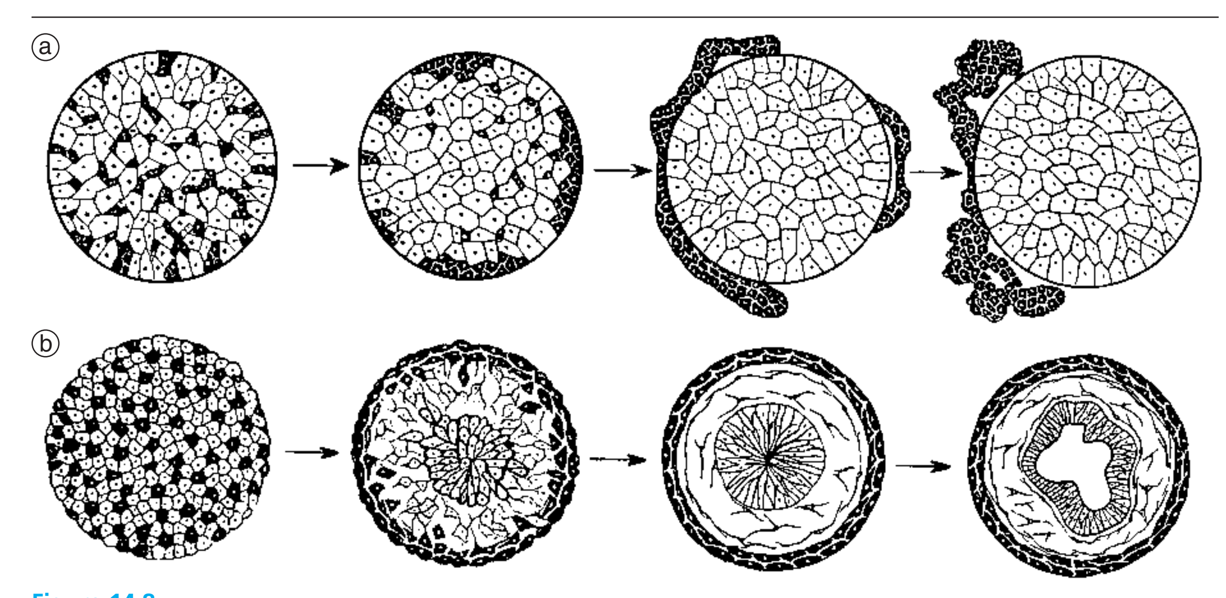


Figure 14.8

Triage cellulaire chez les embryons d'Amphibiens

(a) Lorsqu'on mélange des cellules dissociées d'ectoderme et d'endoderme, on observe la formation d'une couche épidermique externe entourant une masse endodermique. **(b)** Un résultat identique est obtenu si l'on mélange des cellules d'ectoderme et des cellules de la plaque neurale (d'après J. Holtfreter).

d'adhérence et de reconnaissance cellulaires consiste à produire des anticorps qui interfèrent avec ces processus ; en se fixant sur les protéines de surface en question, ces anticorps inhibent tout contact entre cellules et toute adhérence. Dans une première étape, des membranes plasmiques sont purifiées à partir des cellules étudiées grâce aux techniques classiques de fractionnement cellulaire. Par la suite, une banque d'anticorps monoclonaux (voir chapitre 11) est obtenue contre l'ensemble des protéines qui les constituent. Le criblage d'un grand nombre de ces anticorps est enfin effectué sur la base du blocage par ces derniers de l'adhérence cellulaire. Cette approche a permis d'identifier chez les Vertébrés plusieurs types de protéines intervenant dans l'association des cellules entre elles ; trois grandes familles doivent être distinguées : les protéines dites **CAM** (*cell adhesion molecules*), les **cadhérines** et les **sélectines** (voir *figure* 14.9).

• Les **CAM** sont des glycoprotéines transmembranaires à traversée unique, de 1 000 acides aminés environ, fonctionnant par **interaction homophilique** (c'est-à-dire entre molécules identiques portées par deux cellules différentes) selon un mécanisme indépendant des ions Ca^{2+}. Elles font partie, en raison de leur analogie de structure, de la grande famille des immunoglobulines ; le représentant le plus anciennement connu de cette famille est la N-CAM (N pour « cellule nerveuse »). Ces molécules jouent un rôle important dans le

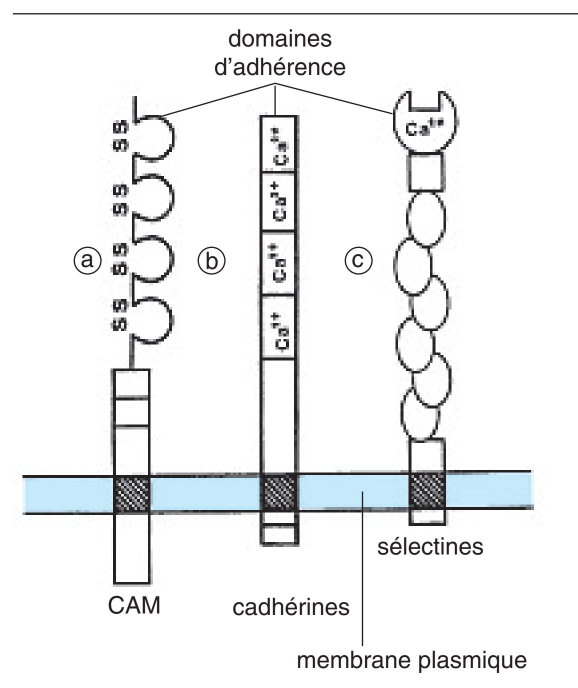


Figure 14.9

Différents types de protéines membranaires d'adhérence

Exemples de représentants des : **(a)** CAM ; **(b)** cadhérines ; **(c)** sélectines.

développement du système nerveux central en favorisant l'adhérence cellulaire ; les anticorps anti-N-CAM perturbent *in vitro* comme *in vivo* le développement des cellules de la rétine. Diverses formes sont codées par un seul gène présentant un phénomène d'épissage alternatif (voir chapitre 8).

• Les **cadhérines** sont des glycoprotéines transmembranaires à traversée unique (de 700 acides aminés environ) possédant une volumineuse région extracellulaire. Elles nécessitent les ions Ca^{2+} et fonctionnent par interaction homophilique en subissant une modification conformationnelle importante sous l'action de ces ions. La plus connue est la cadhérine E (ou **ovomoruline**), qui est présente à la surface de nombreuses cellules épithéliales chez l'adulte ; on la trouve en particulier au niveau des ceintures d'adhérence, où elle constitue un lien transmembranaire qui connecte les cytosquelettes corticaux d'actine de cellules voisines. Elle a été mise en évidence dans les embryons de Mammifères, où elle participe au tassement des blastomères : au départ peu attachées les unes aux autres, les cellules se rapprochent ainsi puis contractent des liens étroits par des jonctions intercellulaires. Les cadhérines N et P sont spécifiques respectivement des cellules nerveuses ou cardiaques et des cellules du placenta ou de l'épiderme. Des anticorps anti-cadhérine E empêchent *in vitro* la peau d'oiseau de bien se former. On rappelle que les cadhérines sont présentes dans les desmosomes ponctuels : demogléines et desmocollines.

• Les **sélectines** sont des protéines d'adhérence transmembranaires qui se lient par des groupements polysaccharidiques.

Le début du développement embryonnaire montre bien comment les changements des propriétés d'adhérence des cellules sont associés aux événements d'organogenèse. Au stade blastula, les cellules de l'ectoderme embryonnaire expriment la cadhérine E ; lorsque le tube neural se pince et se referme, les cellules qui le constituent cessent d'exprimer la cadhérine E et fabriquent alors de la cadhérine N (ainsi que des N-CAM). Les cellules de la crête neurale qui s'en détachent cessent d'exprimer ces deux marqueurs et les réexpriment éventuellement plus tard (voir plus loin). La perte des protéines d'adhérence est une condition indispensable, de façon générale, pour la migration cellulaire, comme le montre l'encart suivant.

ENCART BIOMÉDICAL

Adhérence cellulaire et métastases

A l'exception de certains cancers (celui de la thyroïde, par exemple), la plupart des tumeurs malignes sont à l'origine de cellules métastatiques qui quittent la tumeur primaire et provoquent des tumeurs secondaires dans d'autres organes. Les poumons, le foie et les os sont les organes les plus touchés par ces invasions malignes. Ce sont les métastases qui font du cancer une maladie redoutable, car l'ablation chirurgicale de la masse tumorale primaire ne suffit plus pour assurer la guérison.

Les étapes de leur formation sont les suivantes : 1) des cellules quittent la tumeur initiale et perdent leur adhérence avec les cellules voisines, 2) elles entrent dans le flux sanguin après avoir franchi la lame basale des capillaires, puis en ressortent, 3) elles envahissent les tissus normaux, adhèrent à leurs cellules et y prolifèrent. Tout ceci implique que ces cellules acquièrent des propriétés de surface particulières leur permettant de se libérer de leur tumeur d'origine et de franchir de nombreuses barrières au cours de leurs migrations.

Des modifications dans la nature et le nombre des molécules d'adhérence sont connues comme favorisant ces processus. Dans le cas du cancer du sein et du mélanome, par exemple, on a montré que les récepteurs membranaires à la laminine jouent un rôle dans le pouvoir métastatique, de même que certains récepteurs à la fibronectine ; les premiers y sont en quantité plus élevée, et les seconds moins abondants que dans les cellules normales. Ces caractéristiques favorisent la pénétration et le franchissement des lames basales, riches en laminine, puis la migration au sein des matrices extracellulaires.

Dans les cancers des tissus épithéliaux, on observe que la diminution des cadhérines E, qui accrochent normalement des cellules entre elles, s'accompagne d'une malignité et d'un pouvoir métastatique élevés. Une perte d'adhérence intercellulaire expliquerait donc la capacité de dissémination de ces cellules ; de plus, la plupart d'entre elles sécrètent des protéases qui attaquent les lames basales et les matrices extracellulaires, favorisant ainsi la dispersion.

3. L'ENVIRONNEMENT IMMÉDIAT DES CELLULES : LES MATRICES EXTRACELLULAIRES

Dans la plupart des tissus animaux ou végétaux, les cellules sont en contact avec un constituant extracellulaire formé de macromolécules sécrétées (protéines et polysaccharides), que l'on appelle la **matrice extracellulaire**. Cette structure, qui remplit les espaces entre les cellules, possède une composition chimique et une organisation complexes et remplit de nombreuses fonctions qui sont longtemps restées insoupçonnées. Outre un simple rôle de consolidation des tissus et de cohésion, les matrices extracellulaires permettent de nombreuses interactions entre les cellules et contrôlent en fait la plupart de leurs activités. Les cellules ne sont pas seulement entourées de leur matrice, elles ne baignent pas simplement dedans comme on l'a cru un moment ; elles contractent avec elle des relations moléculaires étroites, de sorte qu'il s'établit un «dialogue» constant entre les deux constituants des tissus ; ceci est particulièrement vrai chez les Animaux. Même les matrices extracellulaires apparemment inertes (os, cartilage, **paroi cellulosopectique** végétale) sont sans cesse remodelées et adaptent leur architecture aux besoins des cellules ou des organismes.

Malgré une composition et un mode de formation complètement différents, les parois bactériennes sont rangées parmi les matrices extracellulaires. Bien que leur organisation soit plus simple que celle des parois des cellules végétales, dont elles représentent l'équivalent structural, ces structures seront examinées en dernier.

3.1. Nature des matrices extracellulaires

3.1.1. Chez les Animaux

Les matrices extracellulaires sont surtout développées dans les **tissus** dits **conjonctifs** et leurs dérivés, où elles représentent souvent un volume plus important que celui des cellules. La multiplicité des molécules qui les constituent (à laquelle s'ajoutent des variations de leurs proportions) est responsable d'une grande diversité de types dont les propriétés physiques et mécaniques sont aussi différentes que le sont l'os et les dents, le derme et les tendons, la cornée et le liquide synovial, pour ne parler que des Vertébrés. Dans les tissus épithéliaux, ainsi qu'on l'a vu plus haut, cette matrice est essentiellement formée par les **lames basales** sur lesquelles les cellules s'appuient (voir *figure* 14.10). La matrice extracellulaire des tissus conjonctifs est sécrétée par les fibroblastes (tissu conjonctif lâche), les chondroblastes (cartilage) et les ostéoblastes (os). Elle est constituée de trois catégories de molécules organiques : des glycosaminoglycanes, des protéoglycanes et des protéines fibreuses ; les deux premiers forment une «substance fondamentale» très hydratée, ressemblant à un gel, dans laquelle sont noyées les protéines fibreuses.

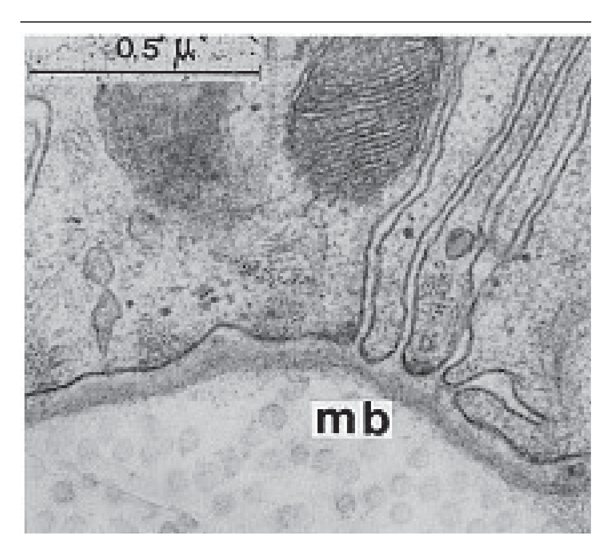


Figure 14.10

Coupe transversale d'une lame basale de cellule épithéliale

Cliché obtenu en microscopie électronique (mb : lame basale) ; × 60 000. Cliché Labo. BC4., Orsay.

• Les **glycosaminoglycanes** (GAG) sont de longs polymères d'unités disaccharidiques contenant un acide uronique (ou un ose) et une osamine acétylée, parfois sulfatée (voir *figure* 14.11). Seul l'acide hyaluronique existe à l'état libre dans la matrice ; son poids moléculaire est très élevé (jusqu'à 8.10^6 Da) et il n'est pas sulfaté. Les autres GAG sont toujours liés de façon covalente à des protéines (protéoglycanes) ; il en existe cinq types majeurs : le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate, le kératane sulfate et l'héparine (masse moléculaire de 4 à 50 kDa).

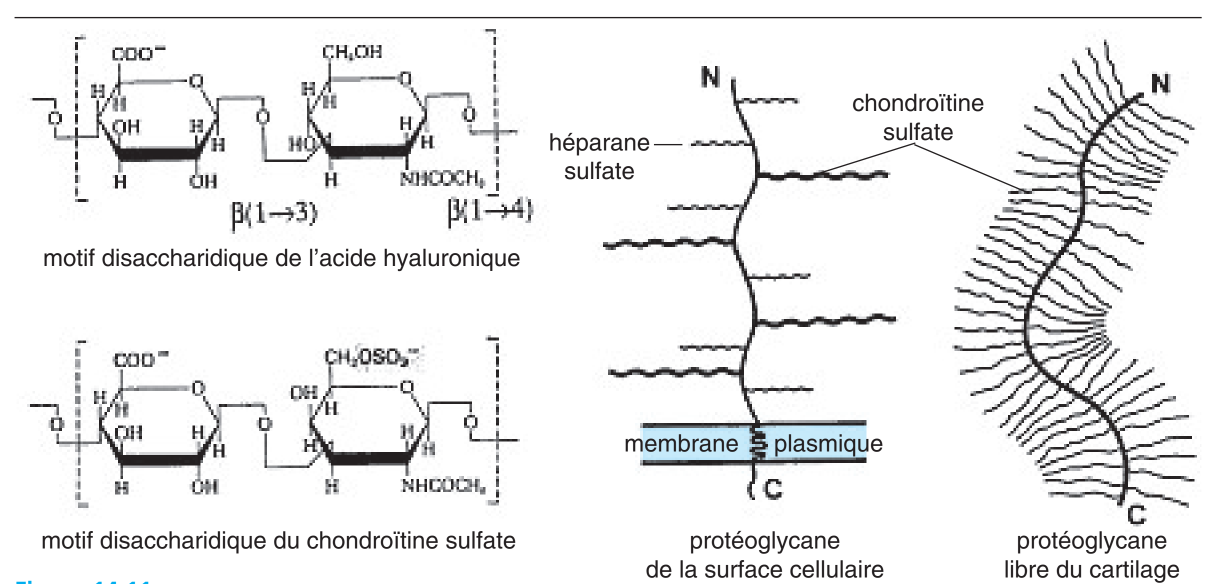


Figure 14.11

Exemples de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes

Ces molécules entrent dans la constitution des matrices extracellulaires des cellules animales.

• Les **protéoglycanes** sont des complexes de protéines et de GAG dans lesquels la composante polysaccharidique est largement prédominante (plus de 90 % en masse). Les chaînes latérales de GAG sont accrochées sur des résidus sérine ou thréonine de la chaîne polypeptidique, dans l'appareil de Golgi, par une liaison de type O-glycosidique (au moyen d'un trisaccharide de liaison : xylose-galactose-galactose). Ces protéines peuvent en outre porter des chaînons oligosaccharidiques N-liés ou O-liés (voir chapitre 9).

Les **protéines fibreuses** se répartissent en deux familles : celles dites structurales (collagène, élastine) et celles dites adhésives (fibronectine, laminine). Les premières confèrent à la matrice résistance mécanique et élasticité, tandis que les secondes servent de moyen d'ancrage ou de support de migration aux cellules de la matrice.

• Les **collagènes** se rencontrent chez tous les Animaux (y compris les Éponges) où ils représentent les protéines les plus abondantes (25 % chez les Mammifères !). Leurs chaînes polypeptidiques (légèrement glycosylées) comprennent 1 000 acides aminés environ, parmi lesquels la glycine et la proline (et son dérivé l'hydroxyproline) sont majoritaires. Elles forment des structures hélicoïdales droites à trois brins de 300 nm de long : le **tropocollagène** (voir *figure* 14.12). On connaît chez les Mammifères une vingtaine de chaînes différentes

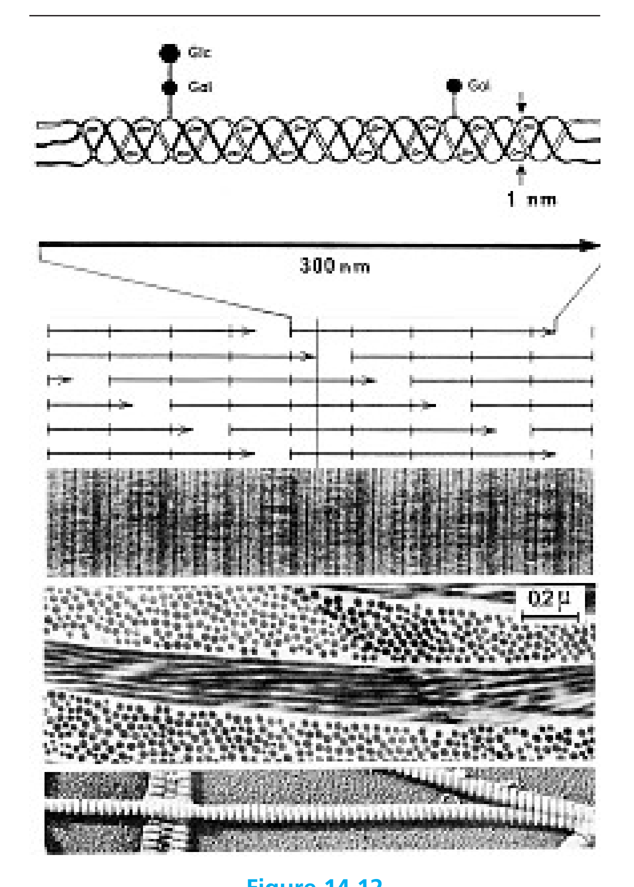


Figure 14.12

Organisation moléculaire et structure des fibres de collagène de type I

Le tropocollagène s'organise en fibres épaisses visibles en microscopie électronique (ombrage métallique ou coupes conventionnelles) dans les tissus conjonctifs.

de collagène (correspondant chacun à un gène particulier) qui s'organisent pour donner une dizaine de combinaisons, dont quatre sont majeures : les collagènes I, II et III se retrouvent dans le conjonctif, tandis que la forme IV est spécifique des lames basales. Les premiers forment de longues fibres résultant de l'accolement (avec un léger décalage de 67 nm) de multiples structures de base tricaténaires ; celles-ci sont liées les unes aux autres par un nombre élevé de liaisons hydrogène interchaînes (entre résidus hydroxyproline) ainsi que par quelques liaisons covalentes. Dans de nombreux tissus, les fibres de collagène sont organisées en faisceaux parallèles plus ou moins serrés prenant parfois une disposition en contreplaqué, particulièrement rigide (os, peau, cornée). Le collagène de type IV forme plutôt des structures en réseau aplati de 50 à 100 nm d'épaisseur.

• L'**élastine** est une protéine de 830 acides aminés, non glycosylée, riche en glycine et en proline, plutôt hydrophobe. De façon unique, elle n'a pas une structure précise, organisée dans l'espace ; cette disposition aléatoire de la chaîne polypeptidique, ajoutée au fait que les diverses molécules sont pontées entre elles, conduit à réaliser un édifice ayant des propriétés élastiques remarquables. On la trouve dans des tissus où l'élasticité a un rôle physiologique important à jouer : peau, poumons, vaisseaux sanguins.

• La **fibronectine** est constituée par un dimère de deux chaînes identiques de 2 500 acides aminés ; cette grosse protéine glycosylée est dite multifonctionnelle car elle peut se lier à de nombreuses autres molécules telles que le collagène, l'héparine et les intégrines membranaires (voir plus loin). Son organisation est remarquable car elle est formée de plusieurs modules identiques et souvent répétés un grand nombre de fois ; elle est codée par un gène « géant » de 70 kb comportant 50 exons !

• La **laminine** est spécifique des lames basales, où on la trouve en même temps que le collagène de type IV et des protéoglycanes particuliers. Elle se présente sous la forme d'un ensemble de trois chaînes polypeptidiques disposées en croix. Comme la fibronectine, c'est une protéine multifonctionnelle glycosylée possédant des domaines de liaison variés, en particulier pour le collagène IV et les intégrines. Elle sert d'intermédiaire entre la cellule et la lame basale (voir *figure* 14.13).

Il faut bien noter que ces deux dernières protéines sont capables de s'accrocher à la fois à la cellule et à la matrice extracellulaire, *via* les intégrines.

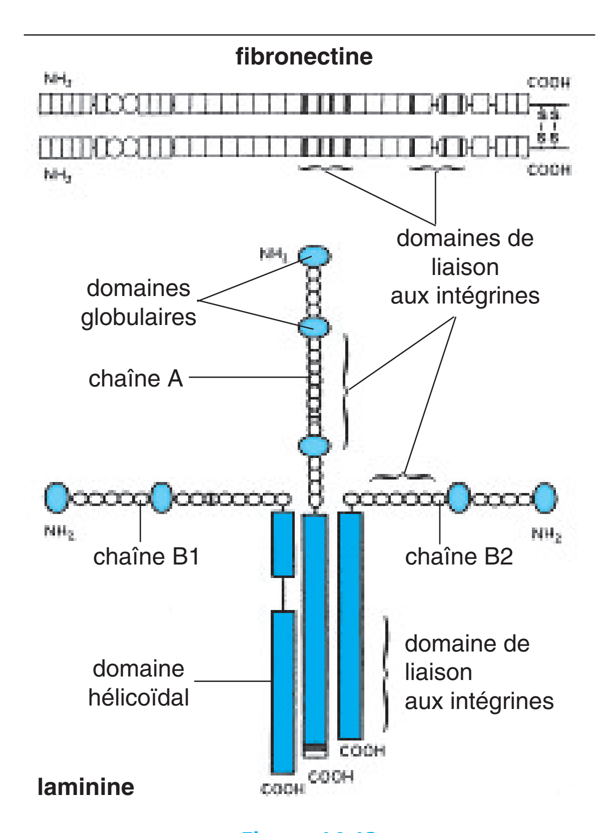


Figure 14.13

Structure schématique de la fibronectine et de la laminine

Ces deux protéines possèdent des domaines de liaison aux intégrines et au collagène, et participent ainsi à la migration cellulaire ou à l'accrochage des cellules aux lames basales.

3.1.2. Chez les Végétaux, les Algues et les Champignons

À de rares exceptions près, les cellules végétales sont caractérisées par la présence d'une paroi rigide ayant un rôle d'exosquelette (voir *figures* 2.8 et 7.19). Celle-ci possède des propriétés mécaniques évidentes permettant le maintien de la taille et de la forme cellulaires. Perméable à l'eau et à la plupart des petites molécules hydrosolubles, elle joue un rôle dans le contrôle des échanges avec le protoplasme sous-jacent ; elle exerce enfin une fonction de protection contre les pathogènes (Bactéries, Virus). Les parois végétales ont une organisation générale commune : un **composant fibrillaire** de nature polysaccharidique, formant une armature rigide autour de la cellule, est entouré d'une **matrice amorphe** (ou ciment). Cette dernière est en majorité polysaccharidique, mais elle contient aussi des glycoprotéines à rôle structural ainsi que diverses enzymes. Suivant les

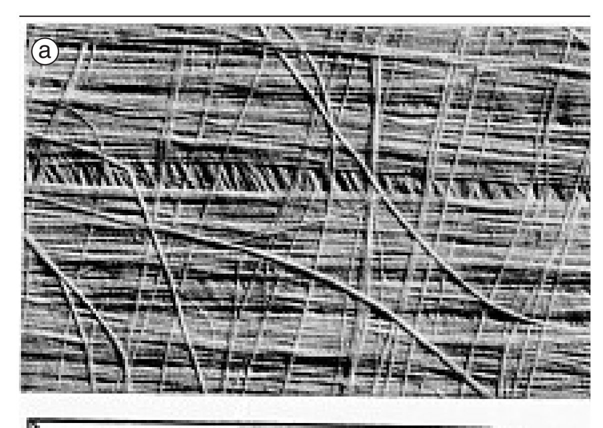
groupes considérés : plantes, Algues ou Champignons, ces deux types de constituants ne se rencontrent pas dans les mêmes proportions et n'ont pas la même nature chimique.

Chez les plantes vertes, le composant fibrillaire est abondant et formé de cellulose, alors que la matrice est formée de pectines, d'hémicelluloses et de glycoprotéines ; le détail de l'organisation de ce type de paroi sera donné plus loin. Chez les Algues, qui constituent un ensemble très hétérogène, il existe une grande diversité de situations qui ne peut être décrite ici ; de façon générale, le composant fibrillaire est peu important et constitué de cellulose ou bien de polymères de mannose (mannanes) ou de xylose (xylanes). La matrice y est particulièrement abondante (jusqu'à 80 % de la matière sèche de la paroi) et elle est constituée de polysaccharides acides et de glycoprotéines très hydrophiles ; certains de ces polysaccharides ressemblent aux pectines des plantes, tandis que d'autres sont spécifiques : il s'agit de composés sulfatés tels que des fucanes (à fucose-sulfate, chez les Algues brunes) ou des carraghénanes (à galactose-sulfate, chez les Algues rouges), d'où on tire les substances appelées **agar-agar** ou **gélose** utilisées comme gélifiants dans les industries alimentaires. Chez les Champignons, la paroi est le plus souvent épaisse mais souple ; elle est constituée de chitine (et de cellulose chez les Oomycètes) pour la partie fibrillaire, tandis que la matrice est riche en glycoprotéines et en glucanes voisins de la callose. Dans ces trois catégories d'êtres vivants, la nature et l'organisation de la paroi constituent une adaptation à un mode de vie particulier : vie aquatique ou aérienne ; nutrition de type autotrophe ou hétérotrophe osmotrophe (voir chapitre 1).

Chez les plantes supérieures, de nombreux types cellulaires peuvent être différenciés sur la base de leur seule paroi. De l'extérieur vers l'intérieur, on distingue classiquement trois éléments de structure au sein de celle-ci : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire.

• La **lamelle moyenne,** qui fait office de «ciment mitoyen» entre deux cellules voisines, est sécrétée et mise en place conjointement par les deux cellules issues d'une division (voir chapitre 12). Elle est de nature pectocellulosique.

• La **paroi primaire** est caractéristique des cellules jeunes et en croissance ou peu différenciées et de type parenchymateux. En général fine et riche en eau, elle est extensible et malléable ; sa composition est assez uniforme (voir plus loin). Dans un type de tissu appelé **collenchyme**, qui a un rôle de soutien chez les organes jeunes en croissance, cette paroi primaire peut s'épaissir considérablement tout en restant de même nature chimique. Les fibres de cellulose y sont déposées en feuillets concentriques disposés alternativement de façon perpendiculaire ou parallèle à l'axe d'allongement de la cellule (structure en contreplaqué ; voir *figure* 14.14). Ces parois sont souples



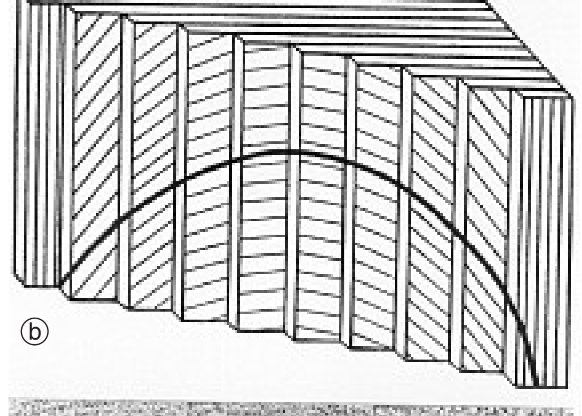




Figure 14.14

Organisation de la paroi chez les Végétaux supérieurs

(a) Aspect obtenu en microscopie électronique, après dissolution de la matrice (technique d'ombrage métallique ; × 21 000) ; noter la disposition perpendiculaire des fibres de cellulose les unes par rapport aux autres). **(b)** Schéma montrant la structure de type contre-plaqué de la paroi secondaire. **(c)** Une légère rotation de l'orientation des fibres de cellulose au niveau de chaque couche rend compte d'une disposition en arceaux visible sur les coupes de microscopie électronique (d'après J.-C. Roland).

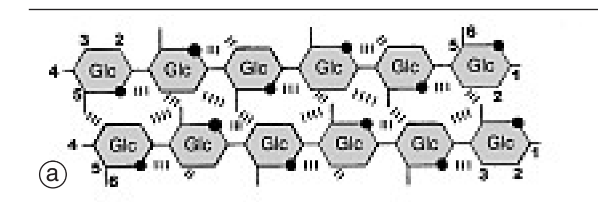
et résistantes, mais aussi plastiques et extensibles, dans la mesure où le réseau de cellulose peut être rompu localement et où les fibres peuvent glisser les unes par rapport aux autres ; elles permettent, sous l'action de facteurs variés, l'élongation de cellules vivantes dans les organes en croissance.

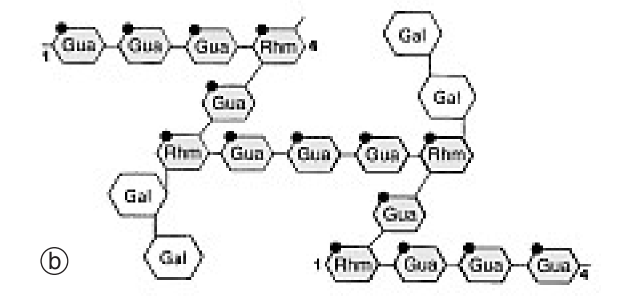
• La **paroi secondaire**, le plus souvent épaisse et pouvant présenter des formes complexes, se rencontre chez les cellules matures, ayant terminé leur croissance. Inextensible, elle est d'une composition très variable et en rapport avec des types cellulaires bien différenciés. On rappelle qu'elle peut servir parfois de réserve de sucres chez certaines graines (voir chapitre 7). Elle est en général élaborée par addition de matériel cellulosique à l'intérieur de l'espace limité par la paroi primaire. Comme précédemment, diverses couches dans lesquelles l'orientation des fibres est différente peuvent être distinguées ; en revanche, la structure fibreuse de cette paroi est plus «serrée» de sorte que celle-ci est beaucoup moins plastique ; de plus, elle se modifie chimiquement à brève échéance et se sclérifie. Le processus consiste en une imprégnation dans toute son épaisseur (mais surtout au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire) par de la lignine qui confère de façon irréversible une stabilité chimique et une inextensibilité totales à la paroi. La **lignine** est un polymère de haut poids moléculaire (un polyphénol) formant en effet un réseau tridimensionnel qui interpénètre la matrice glucidique et glycoprotéique préexistante (incrustation). Divers types de cellules subissent ce processus : les sclérocytes (cellules du **sclérenchyme**) qui sont des cellules de soutien, et les vaisseaux du xylème, qui présentent des parois secondaires souvent discontinues (anneaux, spirales). Dans tous les cas, ces cellules meurent rapidement ; leur cytoplasme et leur noyau dégénèrent en raison du caractère hydrophobe de la nouvelle paroi.

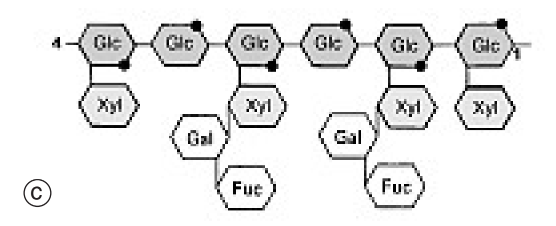
La composition et l'organisation des parois primaires sont très bien connues : la **cellulose** est un long polymère comptant jusqu'à 3.10^4 unités D-glucose (liées par des liaisons β 1-4), qui s'organise en fibres formées de 30 à 40 chaînes parallèles. Ces fibres rigides sont noyées dans un ciment de nature essentiellement polysaccharidique, constitué de **pectines** et d'**hémicelluloses** (voir *figure* 14.15). La composante non polysaccharidique (0,1 à 10 % de la masse sèche) est majoritairement représentée par une glycoprotéine riche en hydroxyproline et nommée **extensine**. La paroi est aussi le lieu d'une importante activité métabolique et elle contient de nombreuses enzymes : endo- et exoglycosidases, transglycosidases, estérases, peroxydases. L'organisation tridimensionnelle de ces quatre constituants est stabilisée par un grand nombre de liaisons hydrogène établies entre les groupements polaires caractéristiques de ces molécules.

3.1.3. Chez les Bactéries

Les Bactéries sont en général entourées par une paroi rigide plus ou moins épaisse, qui leur







Glc = glucose
Gua = acide galacturonique
Xyl =xylose
Gal = galactose
Rhm = rhamnose
Fuc = fucose

Figure 14.15

Principaux polysaccharides constitutifs des parois chez les Végétaux supérieurs

(a) cellulose ; **(b)** pectines ; **(c)** hémicelluloses. Les pectines sont des polymères d'acide galacturonique souvent interrompus par du rhamnose (d'où une disposition en «zig-zag»), et branchés avec des chaînes d'arabinose, de galactose ou mixtes. En présence d'ions Ca^{2+}, elles forment des réseaux et donnent des gels très hydratés. Les hémicelluloses sont des polymères courts, généralement monotones, de glucose, d'arabinose ou de xylose (deux pentoses), branchés avec des oligosaccharides formés eux-mêmes de xylose, de galactose, de fucose.

confère leur forme spécifique et empêche surtout qu'elles n'éclatent sous l'action d'une entrée d'eau due à une pression osmotique très élevée (jusqu'à 20 atmosphères) liée à une forte concentration interne en métabolites. Deux types de paroi fondamentalement différents existent chez les Eubactéries ; ils correspondent à deux groupes distingués, depuis un siècle, sur la base d'un **test** de coloration dit **de GRAM**, et désignés sous les noms de **Bactéries Gram positives** (ou à Gram positif) et **Bactéries Gram négatives** (ou à Gram négatif ; voir chapitre 2). L'encart suivant décrit le principe de ce test très utilisé en bactériologie.

ENCART TECHNIQUE

Le test de GRAM

Ce test porte le nom d'un bactériologiste danois, C. GRAM, qui l'a mis au point en 1884 ; cette technique simple de coloration permet de distinguer deux grands groupes parmi les Bactéries. Le protocole est le suivant :

– les Bactéries sont étalées sur une lame de verre (frottis) puis fixées par chauffage à la flamme ; elles sont ensuite colorées par un colorant violet : le violet de gentiane, puis mordancées par le lugol. Cette opération teinte le cytoplasme de toutes les cellules en violet ;
– un traitement ultérieur rapide à l'alcool décolore certaines Bactéries, alors que d'autres restent colorées en violet ; une contre-coloration de la préparation à la safranine permet de voir les cellules décolorées. Les cellules retenant le violet de gentiane sont dites **Gram positives** tandis que les autres, apparaissant en rose, sont dites **Gram négatives**.

Au départ, cette distinction était purement opérationnelle, et seules les méthodes de la microscopie électronique ont permis de comprendre les raisons précises de la différence de coloration obtenue suivant les souches. En fait, c'est l'organisation de la paroi des Bactéries qui est responsable de ce comportement vis-à-vis de la coloration : chez les Gram négatives, dont le peptidoglycane est très fin, l'alcool pénètre aisément dans le cytoplasme et efface la coloration bleue initiale ; l'épaisseur très importante du peptidoglycane chez les secondes empêche que la décoloration par l'alcool soit efficace.

L'organisation de la paroi d'une bactérie Gram positive (*Staphylococcus aureus*) est prise comme exemple. Cette paroi est constituée pour l'essentiel d'une seule énorme macromolécule appelée **peptidoglycane**, ayant la taille de la cellule et l'entourant à la manière d'un sac. Celle-ci est formée de trois types d'éléments qui sont réticulés en trois dimensions (voir *figure* 14.16). On doit remarquer la présence inhabituelle d'acides aminés D dans cette molécule ; la synthèse des deux peptides de liaison ne met pas en œuvre les mécanismes habituels de la synthèse protéique. La mise en place du peptidoglycane pose des problèmes dont les réponses ne peuvent être données dans le cadre de cet ouvrage mais qui méritent d'être signalés :

Figure 14.16

Structure du peptidoglycane chez *Staphylococcus aureus*

De longues chaînes polysaccharidiques sont constituées d'une succession de disaccharides (dérivés d'oses alternés : N acétyl-glucosamine et N acide acétyl-muramique ; NAG et NAM) ; elles portent latéralement des pentapeptides formés d'une succession d'acides aminés L et D (accrochés aux résidus NAM). Deux chaînes ainsi branchées (NAM pentapeptide-NAG) sont réunies l'une à l'autre par des pentapeptides monotones (dits Gly 5), qui s'accrochent au niveau des résidus n° 3 et n° 4 de deux branches voisines.

– la macromolécule est organisée à l'extérieur de la cellule alors que les précurseurs, qui sont formés au sein du cytoplasme, ne peuvent pas être sécrétés par exocytose (à la manière de ce qui se passe chez les Eucaryotes), ce processus n'existant pas chez les Bactéries ;
– les enzymes qui catalysent l'assemblage final par réticulation sont nécessairement situées à l'extérieur de la cellule, ce qui implique un mécanisme spécifique de transfert de protéines à travers la membrane plasmique (voir chapitre 9) ;
– la croissance cellulaire implique un accroissement constant de la surface du peptidoglycane (qui doit conserver son épaisseur) ; ceci ne peut être réalisé que par un subtil équilibre entre la destruction ménagée de certaines liaisons covalentes dans la macromolécule et l'intercalation simultanée de nouvelles unités de structure.

Les bactéries Gram positives possèdent aussi dans leur paroi des composés spécifiques : les **acides teichoïques**, longues molécules formées d'une succession d'H_3PO_4 et de glycérol (ou de ribitol) liés par des liaisons phosphoester ; divers résidus (sucres, acides aminés) sont branchés latéralement sur les alcools. Ces molécules, qui «pointent» perpendiculairement à la membrane plasmique, à travers le peptidoglycane auquel elles sont liées, sont ou non accrochées aux phospholipides membranaires. La structure comparée des parois des Bactéries Gram positives et Gram négatives a été présentée dans la *figure* 2.13 ; on rappelle que le peptidoglycane de ces dernières est très fin et doublé, à l'extérieur, d'une deuxième membrane phospholipidique. De nombreuses espèces bactériennes possèdent en outre, à l'extérieur de leur paroi, une enveloppe visqueuse appelée **capsule**. Celle-ci est de nature polysaccharidique (molécules de type acide hyaluronique) et protéique ; elle intervient dans les phénomènes d'adhérence des bactéries avec leur substrat ou des cellules entre elles, ainsi que dans la protection des cellules contre divers agents agressifs de l'environnement. Certains de ces composés possèdent des propriétés antigéniques importantes.

3.2. Comparaison entre les matrices extracellulaires des différents groupes d'êtres vivants

La comparaison de la composition et de l'organisation des matrices extracellulaires, chez tous les êtres vivants, conduit à des observations intéressantes. Les points communs sont les suivants : au plan chimique, on trouve dans tous les cas des polysaccharides libres ou liés dont certains éléments constitutifs sont d'une remarquable universalité. On observe ainsi que : 1) un grand nombre de ces polysaccharides sont des polymères de motifs disaccharidiques, 2) la N-acétylglucosamine, décrite dans le peptidoglycane bactérien, se retrouve aussi bien dans la chitine des Champignons et des Insectes que dans les glycosaminoglycanes des Vertébrés, 3) les acides uroniques existent dans les pectines des Végétaux et les glycosaminoglycanes des Vertébrés. On remarque aussi que les deux glycoprotéines extracellulaires majeures trouvées chez les Animaux et les Végétaux ont en commun une grande richesse en proline et en hydroxyproline. Il faut signaler ici la présence remarquable de cellulose, constituant typiquement végétal, dans la composition d'une matrice extracellulaire (la tunique protectrice) particulière sécrétée par l'épiderme des Tuniciers (Animaux marins du groupe des Prochordés).

Au plan de l'organisation, on trouve de façon constante une structure de nature double à base de fibres et de matrice amorphe, semblable à du béton armé et ayant les mêmes propriétés de résistance et de souplesse. On notera aussi la convergence moléculaire étonnante réalisée dans les structures en contre-plaqué observées dans les parois cellulaires épaissies des végétaux supérieurs (à base de fibres de cellulose), et dans les matrices extracellulaires des tissus conjonctifs serrés de l'os ou de la cornée des Vertébrés (à base de fibres de collagène). Enfin, il faut signaler la ressemblance entre le réseau de lignine des parois végétales et le peptidoglycane bactérien, tous deux constituant des systèmes covalents tridimensionnels.

En ce qui concerne les différences majeures entre les Animaux et les Végétaux, on notera que, chez les premiers, il existe une grande diversité des composants de nature protéique (protéines non glycosylées, glycoprotéines, protéoglycanes), alors que les seconds ont surtout diversifié des composés polysaccharidiques libres, neutres ou chargés.

3.3. Interactions entre cellules et matrices

3.3.1. Le contact entre les cellules et leur matrice : les intégrines

Ces protéines, qui constituent le lien direct entre la cellule et sa matrice extracellulaire, ont à ce titre des fonctions très importantes car, non seulement

elles permettent l'accrochage physique entre les deux, mais elles servent ainsi de relais et de système de transmission de signaux (transduction) entre la matrice et le cytosquelette (voir chapitre 11). Elles sont une des clefs des interactions entre la cellule et son environnement immédiat ; de nombreux exemples en seront donnés plus loin. De plus, elles sont impliquées dans les déplacements des cellules sur leur substrat, d'où leur rôle capital au cours du développement embryonnaire. Les **intégrines** sont des protéines glycosylées de la surface cellulaire ; elles sont constituées de deux sous-unités transmembranaires différentes (hétérodimère αβ) possédant un important domaine extracellulaire (voir *figure* 14.17). Elles fonctionnent comme des récepteurs membranaires capables de reconnaître à la fois (au moins dans le cas des fibroblastes, où elles sont le mieux connues) la laminine et la fibronectine, au niveau de séquences communes d'acides aminés spécifiques.

3.3.2. Points de contact focaux et hémidesmosomes

Du côté intracellulaire, les intégrines entrent en contact avec les faisceaux de microfilaments d'actine du cytosquelette, *via* un système complexe de protéines, parmi lesquelles on peut signaler la **taline**, la **vinculine** et l'**α actinine**. Dans les fibroblastes immobiles en culture, toutes ces protéines sont particulièrement concentrées dans les zones d'ancrage au substrat appellées **points de contact focaux** ou **plaques d'adhérence** (voir *figure* 14.17 et chapitre 11). C'est à leur niveau que s'accrochent les puissants câbles d'actine qui maintiennent la forme aplatie de la cellule. Les intégrines ont aussi un rôle à jouer dans la mobilité et les migrations cellulaires. Dans ce cas, elles doivent permettre au contraire une fixation labile et réversible au support : elles sont alors réparties et diluées sur toute la surface cellulaire, ce qui a pour conséquence que le cytosquelette d'actine devient très dynamique (car les microfilaments se polymérisent et se dépolymérisent aisément).

Les **hémidesmosomes** ont la même organisation générale que les desmosomes ponctuels mais ils correspondent à une moitié seulement de leur structure. On ne les trouve que dans les régions où les cellules épithéliales sont en contact avec leur lame basale. Les protéines transmembranaires (**intégrines**) qui partent de la plaque intracellulaire s'enfoncent profondément dans la lame basale où elles ancrent solidement la cellule.

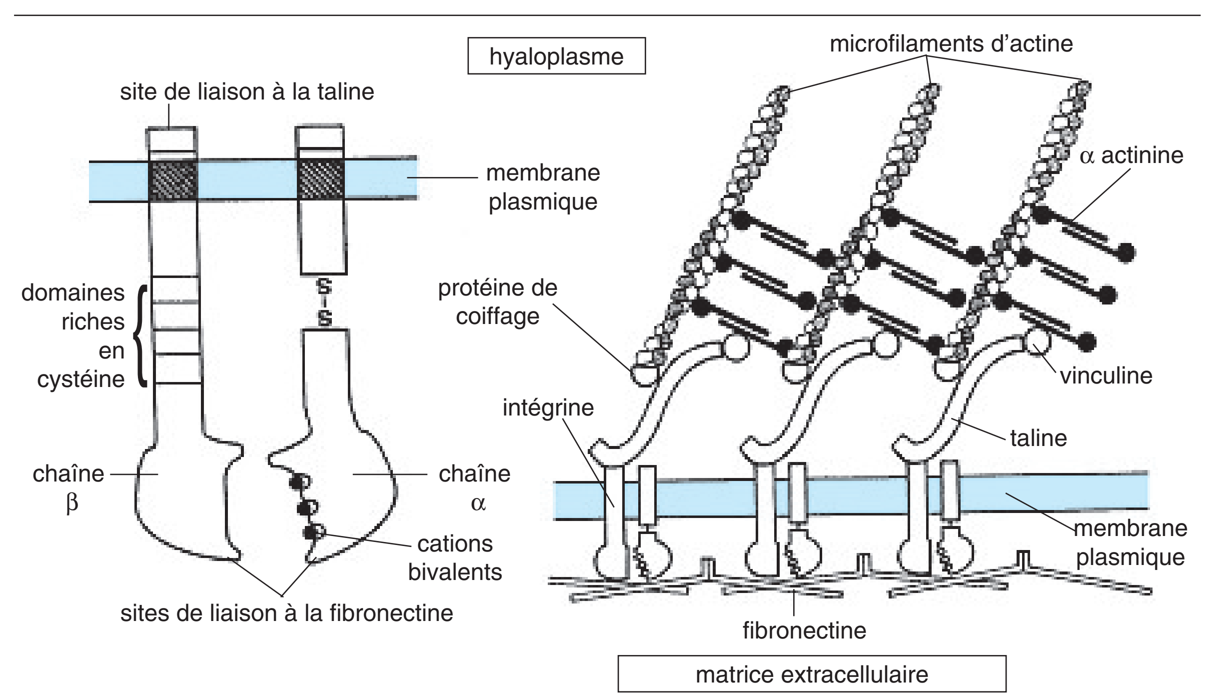


Figure 14.17

Structure générale des intégrines et organisation des points de contact focaux

L'architecture moléculaire complexe de ces derniers permet le rapprochement entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire, à travers la membrane plasmique.

3.3.3. Orientation de la matrice extracellulaire par les cellules elles-mêmes

De nombreux exemples pris dans le monde animal ou végétal montrent que les matrices sont orientées par les cellules qui les sécrètent. L'exemple suivant est particulièrement éclairant : lorsque des fibroblastes sont cultivés sur un milieu contenant des fibres de collagène non orientées, on constate qu'ils contractent des liaisons avec ces fibres et qu'ils peuvent, par leurs déplacements ou leurs déformations, les organiser en câbles alignés ou en feuillets serrés. Cette action peut aussi s'exercer à longue distance, sans doute par un effet d'amorçage d'un processus d'autoassemblage ; les mécanismes exacts qui sont mis en œuvre sont inconnus. On observe également que les fibres extracellulaires de fibronectine présentes dans le support montrent la même disposition et la même orientation que les câbles d'actine contenus au sein de ces mêmes cellules. Cette coïncidence remarquable est due au fait que des connexions s'établissent entre les deux réseaux, à travers la membrane plasmique, au niveau des points de contact focaux, grâce aux protéines transmembranaires nommées intégrines (ici les récepteurs de la fibronectine).

Chez les cellules végétales, le cytosquelette permet aussi d'orienter la répartition des molécules de la matrice ; cette coïncidence concerne ici le réseau de microtubules et les fibres de cellulose. Dans les cellules interphasiques, les microtubules sont essentiellement corticaux et étroitement accolés à la face interne de la membrane plasmique (voir chapitre 11) ; ils sont en outre organisés en faisceaux parallèles disposés perpendiculairement au grand axe de la cellule (axe d'élongation). Or, les fibrilles de cellulose situées juste à l'extérieur de la cellule présentent exactement la même disposition ; ces dernières sont mises en place au niveau de la membrane plasmique grâce à de gros complexes enzymatiques appelés **rosettes de cellulose synthétase**. Il existe un rapport constant entre la présence des microtubules et la production localisée des fibrilles de cellulose, en particulier dans les cellules qui se spécialisent dans la mise en place d'épaississements de la paroi, tels que ceux trouvés dans les vaisseaux du xylème. Ceci est attesté expérimentalement par l'utilisation de drogues qui désorganisent les microtubules ; les cellules ainsi traitées modifient complètement leur programme de différenciation relatif à la paroi cellulosique.

Le mécanisme moléculaire assurant cette correspondance exacte entre les deux systèmes est encore mal compris. Deux modèles proposent que les microtubules guident directement le mouvement des rosettes de cellulose synthétase, en fonctionnant comme des rails, ou bien que l'enzyme soit localisée dans les espaces de la membrane plasmique situés entre les microtubules (le confinement des rosettes entre les rails aboutissant finalement au même résultat que le modèle précédent).

4. DIVERSITÉ DES FONCTIONS DES MATRICES EXTRACELLULAIRES

4.1. Rôle de maintien des cellules individuelles

Ce rôle est évident pour les cellules bactériennes et les Végétaux unicellulaires : Algues telles que *Chlamydomonas*, ou Champignons, comme la levure de bière ; nous ne reviendrons pas sur cet aspect. Les matrices extracellulaires des Végétaux font parfois l'objet d'une minéralisation qui renforce la résistance mécanique de la paroi. Par exemple, les Algues dites «calcaires» ont une paroi imprégnée de calcite ou d'aragonite ($CaCO_3$) ; les Diatomées possèdent une paroi silicifiée, etc. De la même façon, divers Protistes sont protégés par une coque (ou test) extracellulaire, renfermant souvent de la chitine ; on peut citer les exemples de certains Foraminifères (qui ont en général une coquille externe de calcite) ou de certaines Amibes (dites testacées).

4.2. Rôle de «remplissage» et de consolidation des tissus

Chez les Végétaux pluricellulaires, l'ensemble des parois forme un édifice rigide qui assure le port dressé des plantes herbacées ou ligneuses. On doit souligner ici le rôle capital de la **lignification** dans la formation des parois secondaires : son acquisition (il y a environ 500 millions d'années) représente une étape évolutive importante. L'apparition du bois a conduit à l'augmentation et au renforcement des tissus de soutien et de conduction. Ce squelette cellulaire externe a ainsi permis la réalisation d'organismes aériens de très grande taille (jusqu'à 100 m de haut !) et doublement aptes à capturer une quantité importante de lumière par leur feuillage et à pomper efficace-

ment l'eau et les sels minéraux dans le sol, grâce à leurs racines. Dès lors, la conquête rapide du milieu terrestre par les Végétaux devenait possible. L'importance de la biomasse représentée par les matrices extracellulaires des Végétaux aériens est considérable : l'accroissement annuel de la masse de la cellulose seule est de plusieurs milliards de tonnes. La cellulose et la lignine sont les deux molécules organiques les plus abondantes sur la planète ; à elles seules, elles constituent les 3/4 de la biomasse terrestre.

Chez les Animaux, le premier rôle des matrices extracellulaires est celui de remplissage des espaces intercellulaires ; cette fonction est déjà décrite chez les Éponges et les Cnidaires (il suffit de penser à l'abondante mésoglée des Méduses, par exemple). Les organismes les plus simples fabriquent du collagène, des glycosaminoglycanes ou de la chitine, qui sont donc des composés évolutivement anciens. On a vu que les tissus conjonctifs lâches contiennent un enchevêtrement complexe de protéines fibreuses (collagène et élastine) baignant dans un gel très hydraté d'acide hyaluronique et de protéoglycanes (substance fondamentale). Ce gel permet la diffusion aisée de l'eau, des ions, des nutriments, des hormones, des facteurs de croissance et autres moyens de signalisation intercellulaire. Cependant, ces matrices extracellulaires peuvent, dans certains cas, devenir compactes et rigides et former soit des exosquelettes, soit des endosquelettes.

• Les **exosquelettes** sont des matrices sécrétées par les cellules de l'épiderme unistratifié de certains Animaux ; lorsque ces derniers sont aquatiques, cette matrice est souvent minéralisée par du $CaCO_3$. On peut citer à ce sujet la coquille des Mollusques et la carapace des Crustacés (formées d'un mélange de chitine et de protéines, et calcifiées), ou l'exosquelette plus ou moins épais des Cnidaires (par exemple, les coraux) ; celui des Insectes est constitué, par contre, uniquement de chitine et de protéines. On rappelle aussi l'existence de la tunique des Tuniciers, qui est un exosquelette épais, très riche en eau, contenant divers glycosaminoglycanes, et renforcé par des fibres de cellulose. La cellulose et la chitine sont d'ailleurs deux molécules très voisines : ce sont des polysaccharides de type β (1-4) ; un groupement OH est simplement remplacé dans la seconde par un aminoacétyle, au niveau du glucose.

• L'**endosquelette** des Vertébrés (cartilage, os, écailles) provient de l'imprégnation de la matrice, au niveau des fibres de collagène, par des cristaux de phosphate de calcium. Par sa double structure, de type béton armé, l'os est un matériau très résistant : les fibres de collagène lui confèrent une résistance aux forces de traction, alors que les cristaux minéraux lui confèrent une résistance à la compression. Il possède, de plus, une structure en contre-plaqué en raison de la disposition des fibres de collagène qui sont agencées en couches orientées perpendiculairement les unes aux autres. L'os est un tissu vivant, qui subit un remodelage et un renouvellement constants, par le jeu de cellules qui détruisent la matrice minéralisée : les **ostéoclastes**, et de cellules qui la construisent : les **ostéoblastes**.

4.3. Rôle dans le maintien d'un état différencié

Il est démontré que certaines macromolécules des matrices extracellulaires influent sur la forme et la polarité des cellules, ainsi que sur leurs capacités de synthèse et leur différenciation. Si des chondrocytes sont cultivés *in vitro*, sur un milieu structuré (une matrice artificielle formée d'un gel), ils conservent une forme typique arrondie et continuent à sécréter une matrice extracellulaire spécifique, voisine par sa composition chimique (présence de collagène de type II) de celle trouvée dans le cartilage d'origine. Cette aptitude est maintenue à travers de nombreux repiquages ; cependant, si on cultive les cellules à faible densité de population, dans un milieu liquide banal, on constate qu'elles se modifient progressivement. Elles cessent de fabriquer du collagène de type II et se mettent à synthétiser du collagène de type I (codé par un autre gène), à la manière des fibroblastes. Après un mois de culture dans ces conditions, presque toutes les cellules ressemblent à des fibroblastes et fabriquent du collagène de type I.

La matrice extracellulaire influence directement, au moyen d'une boucle de rétroaction encore mal connue, le maintien d'un état différencié ; le rôle des intégrines dans la transduction des signaux extérieurs est fortement soupçonné. Si, par exemple, on ajoute à une culture de chondrocytes de l'acide hyaluronique purifié (qui est normalement sécrété en abondance par les fibroblastes), celui-ci inhibe fortement la synthèse de matrice cartilagineuse et accélère le phénomène de changement décrit plus haut. Inversement, *in vivo* il apparaît que, lors de la croissance du tissu cartilagineux, des cellules de type fibroblastique appartenant au périchondre sont progressivement recrutées et transformées en

chondrocytes. Ce phénomène est donc non seulement auto-entretenu, mais aussi «contagieux».

De même, on observe que les cellules de la cornée (qui, *in vivo,* organisent les fibres de collagène à la manière d'un contre-plaqué) ne synthétisent pratiquement pas de collagène lorsqu'on les cultive sur des surfaces nues (comme le fond des boîtes de culture en plastique). En revanche, si on les ensemence sur un support contenant des molécules de matrice extracellulaire (fibronectine, laminine), elles se mettent à sécréter une grande quantité de collagène. De façon habituelle, les cellules épithéliales cultivées sur support synthétique adhèrent faiblement au substratum ; elles présentent une lame basale mal organisée et leur cytosquelette ne possède pas une architecture typique de ce type cellulaire. Si on les cultive, comme précédemment, sur un support traité par des molécules de matrice, la lame basale devient régulière, l'adhérence est plus forte, les cellules s'étalent bien sur le fond en même temps que leur cytosquelette s'organise normalement. Une cellule peut donc créer un environnement spécifique qui, en retour, renforce sa différenciation.

4.4. Rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire

Un exemple de ce type de contrôle effectué par une matrice extracellulaire est fourni par l'étude du renouvellement des épithéliums. De façon générale, ce renouvellement est assuré par la multiplication de **cellules-souches** immortelles ; dans le cas des épithéliums pluristratifiés (épiderme de la peau), celles-ci sont situées à leur base et elles sont en contact direct avec la lame basale. Ces cellules se divisent indéfiniment et sont à l'origine de cellules qui perdent cette aptitude et se différencient tout en quittant la partie inférieure de l'épithélium. Ce caractère spécifique des cellules-souches ne semble pas pour autant être une propriété intrinsèque puisque, si des cellules de ce genre sont détruites artificiellement, elles peuvent être remplacées rapidement par des cellules voisines qui s'installent sur la lame basale et acquièrent de *novo* le caractère d'immortalité. Comme ceci est clairement sous le contrôle de facteurs externes, on considère que c'est le contact direct de la cellule avec la lame basale qui est un élément déterminant dans le maintien de l'aptitude à proliférer.

De même, on constate que de nombreuses cellules animales cultivées *in vitro* manifestent des propriétés de prolifération très différentes selon leurs conditions de culture. Lorsqu'elles sont maintenues à l'état isolé et en suspension, elles ne se divisent pratiquement jamais. Si, au contraire, on leur laisse la possibilité d'adhérer sur un support, elles peuvent entrer en division, et ceci d'autant plus fréquemment qu'elles s'étalent davantage sur une surface. Un simple changement de forme, lié à des modifications de rapport avec l'environnement entraîne ainsi des modifications biochimiques et moléculaires des cellules, et un changement de leur programme génétique. Le contrôle de la division semble donc associé à l'organisation du cytosquelette (dont on sait qu'il peut être influencé par la matrice extracellulaire) ; on parle de **dépendance d'ancrage** de la division cellulaire pour décrire ce phénomène qui touche les cellules normales. De même, on constate que presque toutes les cellules cancéreuses, qui sont caractérisées par une prolifération anarchique et continue, ont perdu cette dépendance vis-à-vis du substrat pour leur division.

4.5. Rôle dans la migration cellulaire

L'acide hyaluronique et les protéines de la matrice extracellulaire décrites plus haut interviennent de manière capitale dans les phénomènes de migration cellulaire ; si le premier composé est présent dans tous les tissus et fluides des animaux adultes, il est particulièrement abondant dans les tissus embryonnaires. On a montré que leur matrice jouait un rôle dans ces processus au cours du développement précoce, ainsi que dans les tissus de l'adulte en cours de cicatrisation, après lésion. Ceci est illustré grâce à l'exemple classique de la migration des **cellules de la crête neurale** chez les Vertébrés (le poulet, en particulier).

Ces cellules embryonnaires constituent une population originale caractérisée par une capacité remarquable de migration et de colonisation de nombreux territoires de l'embryon. Elles se forment lors de la fermeture de la gouttière neurale, à la limite de l'épiblaste et du neuroblaste. Après une phase de division active, elles acquièrent des propriétés migratrices, se dispersent dans l'embryon et sont à l'origine de nombreux types différenciés : cellules pigmentaires, glandulaires (médullosurrénale, parathyroïde), certaines cellules musculaires, squelettiques ou nerveuses (ganglions du système nerveux périphérique). Plusieurs facteurs sont mis en jeu lors de l'initiation de la migration :

– décrochement des cellules de la membrane basale de l'épithélium initial ;
– perte des propriétés d'adhérence (N-CAM et cadhérines ; voir plus haut) ; ces protéines sont à nouveau exprimées lorsque les cellules s'agrègent pour former les ganglions périphériques ;
– mise en place d'espaces de migration grâce à une production en masse d'acide hyaluronique ; ce composé, très avide d'eau, provoque un gonflement de la matrice extracellulaire et tend à séparer les cellules les unes des autres. Il facilite ainsi le déplacement des cellules mobiles, d'autant plus qu'il possède d'évidentes propriétés de lubrifiant. Quand cette période est terminée, l'acide hyaluronique est dégradé par une enzyme nommée **hyaluronidase** ;
– mise en place de voies de migration grâce à des protéines servant de support, telles que la fibronectine et la laminine.

On a montré que ces dernières permettent un déplacement actif des cellules migratrices ; en effet : 1) elles guident *in vitro* le déplacement des cellules ; si le fond d'une boîte de Pétri est recouvert d'une bande étroite de l'une de ces deux molécules, on observe que les cellules de la crête neurale se déplacent exclusivement sur cette bande ; 2) la distribution *in vivo* de ces deux molécules, au sein de l'embryon, est exactement corrélée avec le déplacement des cellules ; elles apparaissent toujours peu de temps avant le début de la migration ; 3) des anticorps dirigés contre les récepteurs cellulaires de la fibronectine (ou contre la fibronectine elle-même), injectés aux embryons, perturbent considérablement la migration des cellules et l'organogenèse qui s'en suit. La directionnalité du mouvement est sans doute assurée par des mécanismes chimiotactiques encore mal connus. Les trajets des cellules de la crête neurale sont parfaitement définis au sein de l'embryon ; ils diffèrent selon les espèces et selon le niveau d'origine des cellules le long de l'organisme.

4.6. Rôles spécifiques de certaines lames basales

Un rôle important, particulier à certaines lames basales, est celui de **filtration moléculaire**. L'exemple le plus classique est celui de la lame basale du glomérule rénal qui filtre le sang pour former le filtrat urinaire (voir *figure* 14.18) : les cellules et la plupart des protéines ne franchissent pas cette barrière et sont retenues dans le plasma sanguin, alors que l'eau, les ions et les petites molécules passent aisément. Il s'agit d'un véritable tamisage des molécules, en fonction de leur taille et de leur charge, car la lame basale se comporte comme un gel lui-même chargé et dont la maille, très précise, peut cependant être variable. Une situation voisine est réalisée dans les alvéoles pulmonaires. Les lames basales qui entourent toutes les cellules formant les capillaires de l'organisme ont aussi un rôle de filtration moléculaire ; dans ce cas, cette barrière peut être sélective car, sous certaines conditions, elle laisse passer des cellules telles que les macrophages ou les lymphocytes qui pénètrent ainsi dans les tissus conjonctifs pour y accomplir leurs fonctions défensives.

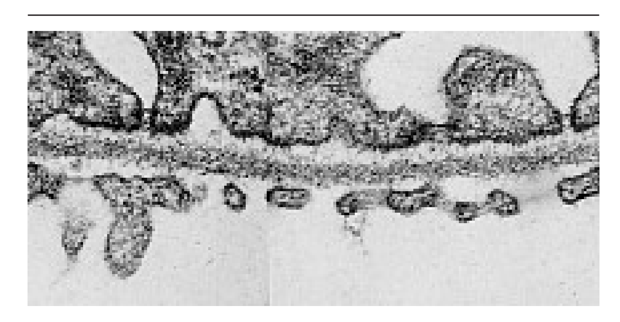


Figure 14.18
Lame basale du glomérule rénal
Cette lame basale particulière a une épaisseur double des autres, car elle provient de l'accolement de celle des cellules endothéliales des capillaires et de celle de l'épithélium glomérulaire. Ces deux monocouches cellulaires sont fénestrées (forment des interstices), de sorte que les contenus des lumières des deux cavités ne sont séparés que par la lame basale commune ; cliché Labo. BG., Orsay.

Les lames basales entourant les cellules musculaires lisses ou striées servent enfin à souder les cellules les unes aux autres et à maintenir la cohésion du tissu. Si l'on ajoute à ceci leur rôle dans le maintien de l'état déterminé des cellules-souches épithéliales, évoqué plus haut, on doit conclure à une polyvalence fonctionnelle considérable de ces structures si discrètes et apparemment anodines.

5. COMMUNICATION À DISTANCE ENTRE CELLULES AU SEIN DE L'ORGANISME

Outre les contacts directs entre cellules voisines, la réalisation et le bon fonctionnement d'un organisme pluricellulaire nécessitent également l'éta-

blissement de communications à longue distance entre cellules appartenant à des organes différents. La description de ces phénomènes à l'échelle de l'organisme et l'étude des mécanismes qui sont mis en œuvre relèvent classiquement de la physiologie animale ou végétale, et débordent le cadre de cet ouvrage. Cependant, ils présentent des aspects cellulaires dont certains ont été évoqués dans les chapitres précédents. Nous nous contenterons donc ici de rappeler les principales notions relatives à la **communication chimique** entre les cellules. La communication à distance au sein d'un organisme remplit deux fonctions essentielles.

• Elle permet tout d'abord de régler la croissance et le rythme de division des cellules, de façon à assurer le développement harmonieux des tissus et des organes. De plus, elle assure un contrôle permanent du fonctionnement individuel de ces derniers, de façon à adapter leur action aux besoins de l'organisme ou aux variations du milieu. Enfin, elle participe, chez les organismes les plus complexes, à la nécessaire coordination des activités des différents organes entre eux.

• Elle permet aussi, en particulier chez les Animaux, d'établir un échange rapide d'informations entre parties parfois très éloignées de l'organisme. Celui-ci se réalise entre des organes sensoriels percevant des stimuli chimiques ou physiques, d'origine interne ou bien provenant du milieu environnant, et d'autres organes, dits effecteurs, qui induisent une réaction adaptative et un comportement parfois complexes.

Chez ces derniers, cette communication à distance met en jeu des substances chimiques, appelées **transmetteurs**, qui sont sécrétées par un type cellulaire donné et sont perçues par d'autres cellules qui réagissent en conséquence. La transmission de cette information chimique prend différentes formes qui peuvent être classées en fonction de la distance que doit parcourir le transmetteur et donc de son mode de transport.

• Le mode de transmission **endocrine** (**signalisation hormonale**) implique l'existence de glandes spécialisées qui fabriquent et sécrètent des **hormones** (voir chapitre 9) ; celles-ci sont véhiculées par le milieu intérieur et distribuées dans tout l'organisme. Seules certaines cellules-cibles répondent au signal, après que ce dernier ait été reconnu par des récepteurs de la membrane plasmique ou du hyaloplasme (voir chapitre 13), selon qu'il s'agit d'hormones polypeptidiques hydrophiles ou de composés hydrophobes susceptibles de diffuser à travers les bicouches lipidiques. Ces mécanismes sont assez lents (plusieurs minutes, au minimum) car ils nécessitent la diffusion de l'hormone dans les liquides intersticiels, au départ et à l'arrivée, ainsi que le transport sanguin. Il faut ajouter à ceci le temps de réponse de la cellule-cible, qui peut être long si des mécanismes d'expression génique sont mis en jeu.

• Le mode de transmission **paracrine** implique la sécrétion, par diverses cellules non organisées en glandes, parfois isolées, de médiateurs à action très localisée, c'est-à-dire agissant sur des cellules-cibles proches des cellules émettrices. La diffusion de ces signaux dans l'organisme est très réduite (rayon d'action de l'ordre du millimètre) car ils sont sécrétés en faibles quantités et sont ensuite soit rapidement captés par les cellules-cibles, soit détruits par des enzymes extracellulaires. Dans cette catégorie de transmetteurs entrent en majorité les **facteurs de croissance** (ou cytokines), qui sont des composés protéiques ayant la propriété de stimuler la prolifération et la différenciation de types cellulaires particuliers (voir chapitre 13). La sécrétion d'histamine par les mastocytes, au cours de la réaction inflammatoire, entre également dans cette catégorie de processus (voir chapitre 6).

• Le mode de transmission **synaptique** met en jeu des **neurotransmetteurs** sécrétés au niveau de jonctions spécialisées appelées **synapses chimiques**, établies entre cellule sécrétrice et cellule-cible. Ce type de communication est spécifique du système nerveux, d'où le terme de neurotransmetteur. En raison de l'étroite relation existant entre les deux partenaires concernés, ce dernier n'agit que sur l'unique cellule-cible adjacente, ce qui entraîne une très grande précision dans le transfert de l'information. La contrepartie de ceci est que les cellules nerveuses doivent présenter, pour conduire l'information à longue distance, une morphologie très particulière, caractérisée par des prolongements cellulaires atteignant des tailles considérables (plus d'un mètre de long). Ce sont des signaux électriques parcourant à grande vitesse ces prolongements qui entraînent la libération du neurotransmetteur au niveau de leur seule terminaison ; les courants électriques mis en jeu ont pour origine divers transporteurs ioniques spécifiques portés par la membrane plasmique des neurones (voir chapitre 6). Enfin, l'architecture remarquable de ces cellules est en grande partie déterminée par les éléments de leur cytosquelette (voir chapitre 11).

Perspective biomédicale

Les maladies du collagène et de la matrice extracellulaire

Maladies non génétiques

– Le scorbut, qui jadis touchait gravement les marins au long cours, est une maladie provoquée par une carence en acide ascorbique (la vitamine C, que l'on trouve dans le jus d'orange, par exemple). Ses manifestations sont multiples : fragilisation des vaisseaux sanguins, hémorragies viscérales, douleurs dans les articulations, déchaussement des dents, etc. Ces phénomènes sont dus à une dégradation rapide du collagène, qui n'est pas remplacé. La vitamine C est en fait le cofacteur des enzymes de type prolyl-hydroxylases, qui hydroxylent la proline du collagène ; cette étape est indispensable pour la formation ultérieure de la triple hélice de procollagène, au sein du réticulum rugueux. Les chaînes défectueuses, qui ne peuvent s'associer entre elles par des liaisons hydrogène, sont dégradées et la synthèse du collagène est stoppée, d'où toutes les anomalies observées dans les matrices extracellulaires de nombreux tissus.

– Le lathyrisme est une maladie par empoisonnement du bétail (les jeunes veaux). Elle se manifeste par des anomalies telles qu'une grande fragilité des os, qui se cassent ou se tordent, des déformations de l'aorte, ou des hernies abdominales. Les graines de *Lathyrus* (une gesse, Fabacée commune) contiennent un poison qui inhibe l'activité d'une amino-oxydase nécessaire pour assurer l'hydroxylation de certaines lysines du collagène (et ensuite le pontage covalent entre les chaînes). Après extraction, le collagène de ces animaux est anormalement soluble, *in vitro*.

Maladies génétiques

– L'*osteogenesis imperfecta*, dite aussi maladie « des os de verre », est une affection autosomale dominante touchant un individu sur 10 000 ; elle présente un phénotype très variable, allant de la létalité *in utero* jusqu'à une fragilité plus ou moins grande des os, qui peuvent parfois se briser très aisément. Elle est due à une anomalie des molécules de collagène de type I, qui entre dans la constitution de la matrice extracellulaire (minéralisée) des os. Des mutations ponctuelles ou des délétions plus ou moins importantes dans les deux gènes du collagène de type I (alpha 1 et 2) entraînent une malformation des triple-hélices, leur instabilité et leur dégradation dans le réticulum rugueux. De fait, toute la synthèse protéique est affectée chez ces individus.

– Les chondrodysplasies (le syndrome de Stickler, par exemple) sont des maladies du cartilage se traduisant par des malformations des os et des articulations. Elles sont liées à des mutations dans le gène du collagène de type II, qui est très abondant dans ces tissus.

– Le syndrome d'Ehlers-Danlos, dit aussi maladie « de la peau fragile » ou des « articulations hypermobiles », est dû à l'existence d'un collagène de type III défectueux. L'anomalie concerne le processus d'élimination des deux propeptides N et C terminaux des triple hélices, qui s'effectue mal, en raison de l'absence de l'enzyme appropriée. Ceci empêche la formation de longues fibres de collagène et conduit à la construction de faisceaux désordonnés et non organisés en fibrilles bien structurées et résistantes (comme on en trouve dans les tendons normaux). Les individus affectés par cette maladie dominante grave (qui se traduit par une rupture des artères, du colon, de l'utérus) meurent aux environs de quarante ans.

– Le syndrome d'Alport est une affection héréditaire fréquente (1 individu sur 5 000), dominante et liée au sexe (chromosome X). Elle se manifeste par des anomalies glomérulaires, une insuffisance rénale (hématurie), des atteintes oculaires, etc. A l'échelle ultrastructurale, on détecte des irrégularités au niveau des lames basales de divers types cellulaires. Il s'agit ici d'un défaut au niveau du collagène de type IV, dû soit à des délétions, soit à des mutations ponctuelles du gène correspondant.

RÉSUMÉ

Chez les Animaux et les Végétaux (au sens large), on connaît des organismes de construction simple, intermédiaires entre les unicellulaires et les pluricellulaires complexes, qui permettent d'imaginer les étapes ayant permis de passer des premiers aux seconds au cours de l'évolution. Les Spongiaires et les Cnidaires, d'une part, et la série morphologique des Volvocales, d'autre part, illustrent les conditions nécessaires à l'établissement de la pluricellularité. L'état différencié se définit à différents niveaux : l'étude morphologique recense plus de 200 types cellulaires chez les Animaux supérieurs et environ 20 chez les Végétaux. La différenciation biochimique et physiologique découle de l'exacerbation du développement de certains organites et de la synthèse préférentielle ou exclusive de protéines spécifiques ; les isozymes constituent un exemple de régulation quantitative fine de l'expression des gènes. L'approche actuelle de la différenciation cellulaire est moléculaire et utilise des sondes nucléiques qui permettent d'étudier directement la production d'ARNm spécifiques.

L'acquisition d'un l'état différencié par les cellules au cours du développement embryonnaire est progressive et résulte de deux types d'événements complémentaires. Une hétérogénéité cytoplasmique initiale de l'œuf permet de comprendre un certain nombre de situations de différenciation ; cependant, le phénomène majeur consiste dans l'existence d'interactions entre cellules proches au sein des embryons (phénomènes d'induction). L'état déterminé, c'est-à-dire l'engagement irréversible dans une voie de spécialisation donnée, et l'état différencié se transmettent à travers les divisions cellulaires, aussi bien dans les situations normales que dans celles pathologiques (tumeurs). Chez les Animaux supérieurs, la plupart des cellules différenciées sont incapables de revenir à un état moins spécialisé, situation fréquente en revanche chez les Végétaux supérieurs. Chez ces derniers, il est en effet possible de reconstituer une plante entière à partir d'une seule cellule différenciée de l'adulte ; quelques Animaux inférieurs conservent des cellules totipotentes permettant une régénération totale ou partielle de l'organisme.

À la différence des Végétaux, chez qui les cellules sont séparées par des parois extracellulaires, les cellules des Animaux contractent des liens étroits entre elles au moyen de dispositifs spécialisés ou de protéines membranaires assurant l'adhérence au sein des tissus. Les dispositifs d'ancrage des cellules épithéliales animales sont souvent des dépendances du cytosquelette : les ceintures d'adhérence sont constituées de microfilaments, tandis que les desmosomes sont en relation avec les filaments intermédiaires. Les jonctions serrées soudent de manière étanche les membranes des cellules dans la zone apicale des épithéliums. Au sein des organismes pluricellulaires, les cellules communiquent directement entre elles, grâce aux jonctions communicantes chez les Animaux et aux plasmodesmes chez les Végétaux. Les premières permettent le seul passage de petites molécules, tandis que les seconds sont de fins canaux membranaires laissant passer les macromolécules.

L'adhérence cellulaire au sein des tissus animaux est démontrée par des expériences de dissociation et de réassociation *in vitro* de cellules artificiellement séparées. Plusieurs grandes familles de glycoprotéines membranaires responsables de ce phénomène sont connues : CAM, cadhérines et sélectines ; ces molécules contractent des liens étroits entre elles, avec ou sans l'aide des ions Ca^{2+}. Les matrices extracellulaires existent chez tous les êtres vivants, y compris les Bactéries ; elles constituent une enveloppe glycoprotéique plus ou moins épaisse et rigide. Chez les Animaux, elles sont très développées dans les tissus conjonctifs, mais elles existent aussi dans les tissus épithéliaux, sous la forme des lames basales. Leurs constituants majeurs sont des glycosaminoglycanes, des protéoglycanes et diverses protéines fibreuses, en particulier le collagène. Les parois des Végétaux constituent un exosquelette rigide ; leur composition est variable selon les groupes, mais le principe de leur construction est constant : une matrice amorphe glycoprotéique renforcée par un composant fibrillaire polysaccharidique. Les parois secondaires participent de façon importante à la différenciation des différents tissus des plantes.

Les cellules établissent de nombreux contacts avec leurs matrices extracellulaires par l'intermédiaire de protéines transmembranaires : les intégrines qui entrent en relation avec le cytosquelette et participent à la locomotion. On reconnaît de multiples fonctions, souvent capitales, aux matrices extracellulaires : remplissage et consolidation des espaces extracellulaires, maintien de l'état différencié, contrôle de la prolifération et migration cellulaire.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Décrire une expérience démontrant que les différentes cellules d'un organisme pluricellulaire primitif sont capables de se reconnaître et de s'associer pour former des tissus.
2. Quelle série morphologique décrit-on chez les Algues pour illustrer la notion d'accroissement de complexité au cours du passage de l'état unicellulaire à l'état pluricellulaire ? quelles règles générales dégage-t-on ?
3. Combien de tissus morphologiquement différents compte-t-on chez un Animal et un Végétal supérieurs ?
4. Donner quelques exemples de différenciation biochimique, physiologique et moléculaire chez les Animaux.
5. En embryologie, qu'appelle-t-on détermination cellulaire et différenciation terminale ? quelles différences fondamentales existent entre ces deux états des cellules ?
6. Rappeler les caractéristiques majeures de l'état différencié chez les Animaux et les Végétaux.
7. Pourquoi peut-on dire que les cellules des Végétaux supérieurs ont conservé une totipotentialité qui n'a pas d'équivalent dans le règne animal ?
8. Décrire brièvement les dispositifs cellulaires spécialisés qui permettent l'accrochage entre les cellules animales.
9. Décrire les différents dispositifs qui assurent une communication directe entre cellules chez les Animaux et les Végétaux.
10. Qu'appelle-t-on symplasme et apoplasme chez les Végétaux ?
11. Comment met-on en évidence les propriétés d'adhérence qui caractérisent les cellules d'un même tissu d'un Animal supérieur ?
12. Nommer les principales familles de protéines d'adhérence chez les Animaux et décrire leurs caractéristiques principales.
13. Qu'appelle-t-on matrice extracellulaire ? quelle est son origine chez les êtres vivants procaryotiques ou eucaryotiques ?
14. Quels sont les constituants majeurs des matrices extracellulaires chez les Animaux ?
15. Comment est organisée moléculairement une fibre de collagène de type I ?
16. Dans quels tissus animaux rencontre-t-on en abondance le collagène et l'élastine ?
17. Décrire brièvement les matrices extracellulaires des Végétaux, des Algues et des Champignons. Quels sont leurs constituants majeurs ?
18. Quelles sont les différences chimiques qui existent entre la paroi primaire et la paroi secondaire des plantes supérieures ? quelles conséquences ont-elles sur les propriétés de ces parois ?
19. En quoi les enveloppes des Bactéries Gram positives et Gram négatives diffèrent-elles ?
20. Qu'appelle-t-on «intégrines», et dans quelles structures membranaires les rencontre-t-on ?
21. Citer les principales fonctions assurées par les matrices extracellulaires chez les Animaux et les Végétaux.
22. Rappeler les divers modes de communication à distance qui peuvent s'établir entre les cellules d'un organisme animal.
23. Donner un exemple de lame basale remarquable ayant un rôle physiologique très important au niveau de l'organisme lui-même (chez les Vertébrés supérieurs).



Chapitre 15

AUX CONFINS DU MONDE VIVANT : VIROÏDES, PLASMIDES ET VIRUS

La question des prions

À la lisière du monde vivant, qui est clairement défini par son dénominateur commun, la cellule, il existe un vaste ensemble d'entités variées, non vivantes, mais qui partagent de nombreuses caractéristiques avec les êtres vivants, et interfèrent avec leurs processus physiologiques. Cet univers, qui est abordé par les mêmes méthodes et avec les mêmes concepts que ceux employés en biologie cellulaire et moléculaire, comprend plusieurs types d'éléments génétiques d'organisation souvent très simple, puisque certains sont réduits, à la limite, à une seule molécule. Par ordre croissant de complexité, on distingue les viroïdes, les plasmides et les Virus ; tous ces «êtres» ne peuvent se reproduire seuls et sont totalement dépendants des cellules vivantes pour leur multiplication et l'accomplissement de leur cycle.

Les viroïdes et les plasmides sont des entités autoréplicatives réduites à leur seul matériel génétique, qui restent toujours confinées dans la cellule-hôte et font l'objet d'une transmission essentiellement verticale. Malgré une grande simplicité de leur architecture en général, et bien qu'ils soient des parasites obligatoires, les Virus présentent une phase libre dans leur cycle de reproduction, pendant laquelle leur matériel génétique est protégé par au moins une coque protéique. Enfin, on ne peut pas ne pas évoquer, dans ce chapitre, la question très actuelle des prions ou, plus exactement, des agents transmissibles non conventionnels (ATNC) ; ces particules infectieuses pourraient ne pas être dotées de matériel génétique propre.

Les Virus étant responsables de nombreuses pathologies graves chez les Animaux et l'Homme, la virologie a d'abord été essentiellement une discipline médicale. La découverte des mécanismes moléculaires de leur reproduction, qui sont semblables à ceux des cellules qu'ils parasitent, a conduit, dans les années 60, à rapprocher la virologie de la biologie moléculaire, dont elle est désormais une branche à part entière. Plus récemment, c'est grâce à l'étude de la biogenèse des Virus au sein des cellules eucaryotiques que de nombreux problèmes de biologie cellulaire ont pu être abordés. En effet, en raison de leur simplicité d'organisation, de la brièveté de leur cycle, et parce qu'ils détournent à leur seul profit la machinerie de la cellule-hôte, les Virus constituent un outil très puissant d'analyse expérimentale.

1. VIROÏDES ET PLASMIDES

1.1. Viroïdes

On pensait jusqu'en 1967, que les plus petits agents infectieux chez les plantes et les Animaux étaient les Virus. C'est alors que l'on a découvert une nouvelle catégorie d'agents pathogènes intracellulaires, autoreproductibles et non protégés par une capside : les **viroïdes**. Ces entités sont responsables d'une quinzaine de maladies des plantes, plus ou moins graves, parmi lesquelles on peut citer le Cadang-Cadang du cocotier qui a détruit des palmeraies entières, ce qui a engendré des conséquences économiques très graves ; de nom-

breuses plantes cultivées, horticoles (pomme de terre, tomate, etc.) ou ornementales sont touchées par ces agents. La transmission du vecteur est uniquement mécanique : contact, blessure ou greffe. Ces agents infectieux sont très particuliers à de nombreux égards en raison de leur organisation moléculaire unique.

Il s'agit en fait d'ARN de petite taille (246-375 nucléotides), fermés sur eux-mêmes de façon covalente, et présentant un fort degré d'autocomplémentarité dans leur séquence. Ils montrent donc une structure en double-brin très marquée et une organisation générale en double hélice fermée aux extrémités. Les viroïdes posent plusieurs problèmes fondamentaux de biologie, d'une part car leur capacité de codage est très faible, et d'autre part car ils ne constituent pas, après analyse de leur séquence (ou de celle de leur complément), un ARN de type messager ; leur réplication est totalement dépendante des protéines et de la machinerie de la cellule-hôte. On a montré que les intermédiaires de réplication de ces molécules sont des ARN complémentaires de la séquence infectieuse ; l'ARN polymérase II de la cellule-hôte pourrait être impliquée dans la réplication.

L'expression des viroïdes ne conduisant pas à des protéines spécifiques, la question de leur pathogénicité reste largement ouverte. Plusieurs arguments suggèrent une interférence avec la synthèse des protéines dans les cellules-hôtes. Certains segments de leur séquence sont en effet complémentaires : 1) de la séquence d'un petit ARN nucléaire (*snRNA*) entrant dans la constitution des particules d'épissage (voir chapitre 8) ; 2) de celle de l'ARN 7S, qui est un élément constitutif de la particule PRS intervenant dans l'adressage des protéines (voir chapitre 9). Enfin, on sait que l'ARN du viroïde est capable d'activer une protéine-kinase qui est impliquée, à la suite d'une longue cascade de réactions, dans l'inhibition du démarrage de la synthèse des protéines (voir chapitre 12).

1.2. Plasmides bactériens et eucaryotiques

1.2.1. Caractéristiques générales des plasmides

Les plasmides sont en général des molécules d'ADN double-brin, circulaires, que l'on trouve dans le cytoplasme des Bactéries, au sein duquel elles se répliquent de manière autonome (voir *figure* 15.1). Pratiquement toutes les espèces bactériennes hébergent des plasmides et parfois plusieurs familles distinctes simultanément (jusqu'à 7 ou 8). On connaît aussi des plasmides chez les Eucaryotes, en particulier chez les Champignons ; l'un des plus connus est le **plasmide 2 µ**, qui est une molécule circulaire d'ADN ayant cette taille, et présente dans de multiples souches de levure de boulangerie. Cette molécule est à la base de nombreux plasmides artificiels utilisés en génie génétique des cellules Eucaryotiques. Nous verrons plus loin quelles fonctions remplissent ces mini-chromosomes et quels avantages ils peuvent conférer aux cellules-hôtes.

Encart historique

La découverte des plasmides bactériens

La découverte de ces molécules date d'environ 45 ans, mais elles ont longtemps été considérées comme des exceptions peu intéressantes et sans avenir. Leur importance actuelle tient au fait qu'elles constituent, depuis une vingtaine d'années, un des outils de base du génie génétique. Au début des années 50 fut découverte la sexualité des Bactéries, c'est-à-dire le fait qu'il existe deux catégories de cellules que l'on peut qualifier, eu égard à leur comportement, de « mâles » et de « femelles ». Le caractère mâle est lié à la présence dans le cytoplasme d'une petite molécule circulaire d'ADN, indépendante du chromosome principal. Ce mini-chromosome, qui est transmis aux cellules dites femelles après contact, a été appelé **facteur F** (pour fertilité) ; sa présence s'accompagne d'un phénotype (présence d'appendices extracellulaires appelés pili) et de capacités génétiques bien spécifiques. Des études effectuées au Japon en 1959 sur une Bactérie responsable de la dysenterie (*Shigella dysenteriae*) montrent que plusieurs souches de cet agent pathogène sont devenues résistantes à des antibiotiques habituellement utilisés pour traiter la maladie. De plus, certaines d'entre elles ont acquis simultanément la résistance à plusieurs antibiotiques, ce qui est difficilement compréhensible si l'on admet que les mutations sont le seul mécanisme à la base du phénomène. Il est alors démontré que ces gènes se transmettent d'une cellule à l'autre, éventuellement entre espèces différentes, de la même façon que le facteur F de *E. Coli*. Ce type de facteur est appelé **facteur R** (pour résistance).

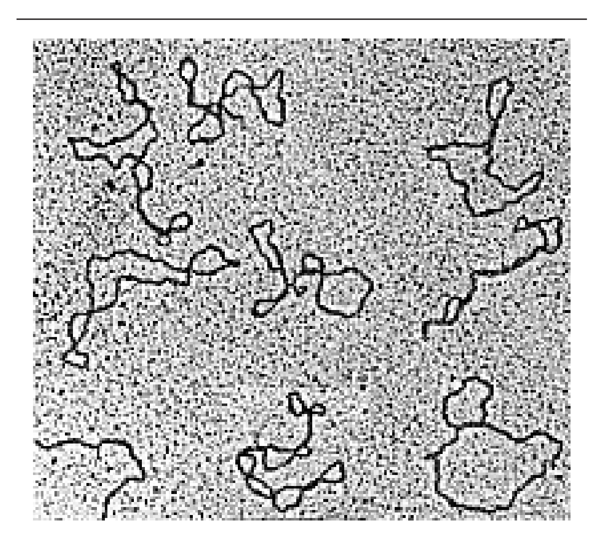


Figure 15.1
Molécules d'ADN plasmidique purifié, observées après étalement et ombrage métallique

La plupart de ces molécules circulaires apparaissent relâchées tandis que d'autres, d'aspect torsadé, présentent un état surenroulé qui est en fait leur état natif.

À partir de ce moment, de nombreuses autres entités, conférant de la même manière des résistances aux antibiotiques à diverses espèces bactériennes (Entérobactéries, Staphylocoques), furent mises en évidence et il apparut que ce que l'on avait considéré comme de simples curiosités avait une signification générale. Les recherches se multiplièrent, d'autant plus que les phénomènes de résistance aux antibiotiques commençaient à prendre des proportions inquiétantes dans les hôpitaux (**infections nosocomiales**).

1.2.2. Organisation génétique et multiplication des plasmides

Les plasmides étant des molécules autoreproductibles, ceci implique qu'ils possèdent :

– une origine de réplication propre (ils constituent donc des unités de réplication, ou **réplicons**) ;
– des mécanismes assurant le contrôle du nombre de copies par cellule.

Certains plasmides existent en effet en une ou deux copies par cellule, alors que d'autres sont présents en plusieurs dizaines d'exemplaires. Pour la réplication, la transcription et la traduction des protéines qu'ils codent, ces mini-chromosomes dépendent entièrement des enzymes et des précurseurs métaboliques de la cellule-hôte. De façon habituelle, leur information génétique est peu importante (moins d'une dizaine de gènes), en dehors des séquences absolument indispensables que l'on vient de mentionner ; leur longueur ne dépasse guère quelques pour cent de la longueur du chromosome normal. Il existe cependant certains plasmides de grande taille qui confèrent à leur cellules-hôtes des propriétés exceptionnelles que nous décrirons plus tard.

La réplication des plasmides se fait régulièrement au cours du cycle cellulaire, et ils se transmettent de cellule à cellule au cours des divisions successives. Si, pour une raison ou une autre, une cellule n'en hérite pas, elle est à l'origine d'un clone qui en sera définitivement dépourvu, ce qui démontre le caractère facultatif de ces génomes. On connaît des conditions expérimentales ou des drogues qui bloquent ou ralentissent spécifiquement la division des plasmides et qui conduisent à leur perte, par dilution, dans les clones successifs. Seuls les plasmides qui se comportent comme le facteur F (dits **conjugatifs**), et qui ont un équipement génétique approprié, peuvent être transmis d'une cellule à l'autre au moyen de la conjugaison. Le phénomène dit de **transduction**, qui met en jeu des échanges par l'intermédiaire de Bactériophages, est aussi un moyen de propager les génomes plasmidiques de façon horizontale.

1.2.3. Diversité des fonctions assurées par les plasmides

Bien que facultatifs, les plasmides confèrent aux Bactéries qui les hébergent des propriétés pouvant leur être favorables dans certains contextes ; elles concernent des mécanismes de résistance à des composés toxiques du milieu, des activités métaboliques particulières, ou interviennent dans des phénomènes de compétition interspécifique.

La première de ces propriétés, qui est à la base de leur découverte, est la résistance aux antibiotiques. Nous avons vu dans le chapitre 4 que certains d'entre eux ont des cibles diverses dans les cellules, au niveau de la réplication, de la transcription ou de la traduction ; d'autres s'attaquent aux mécanismes de fabrication de la paroi bactérienne, comme la pénicilline, qui inhibe la synthèse du peptidoglycane. Les modes d'action de ces drogues sur les Bactéries étant très divers, on comprend que les mécanismes de résistance le seront également. Il n'est pas nécessaire de détruire complètement un antibiotique pour le rendre inactif : une petite modification de structure (ouverture

d'un cycle par hydrolyse, accrochage d'un groupement chimique simple) catalysée par une enzyme banale est suffisante. La plupart des gènes de résistance portés par les plasmides sont de ce type ; ils sont d'ailleurs identiques à des gènes équivalents portés par le chromosome normal (d'où ils proviennent, sans doute, après avoir été capturés grâce à des mécanismes que nous ne détaillerons pas ici).

On peut citer quelques exemples d'enzymes codées par les **gènes plasmidiques**, et fabriquées par leurs cellules-hôtes. Les pénicillinases, sécrétées dans le milieu par les Bactéries résistantes, modifient chimiquement les pénicillines et suppriment leur action avant même qu'elles ne parviennent aux cellules. Des enzymes de type méthylases, phosphorylases, acétylases, etc., accrochent des groupements divers sur la streptomycine ou le chloramphénicol ; ainsi modifiés, ces composés ne reconnaissent plus leur cible au sein de la cellule et deviennent inactifs. De même, l'érythromycine (qui inhibe la traduction en se fixant sur les ribosomes) est inactivée par le mécanisme suivant : une méthylase plasmidique accroche des groupes CH_3 à l'ARNr de sorte que l'antibiotique ne peut plus se fixer à lui. La tétracycline est maintenue à l'extérieur de la Bactérie par des protéines plasmidiques qui ont modifié dans la membrane des transporteurs spécifiques de ce composé.

Une autre propriété, qui constitue un avantage incontestable pour les Bactéries, est la capacité à résister aux métaux lourds que l'on trouve dans le sol (en particulier dans des zones polluées) ou dans certains produits désinfectants (le mercurochrome, par exemple). De nombreux plasmides portent des gènes de résistance aux sels de mercure, de cadmium, de plomb, de bismuth, d'antimoine, etc. Le mécanisme en jeu consiste ici dans la synthèse de protéines porteuses qui chassent des ions hors de la cellule, à travers la membrane plasmique.

Diverses substances fabriquées par les Bactéries, et qui sont toxiques pour d'autres Bactéries ou pour les organismes supérieurs, sont liées à la présence de plasmides. De nombreux syndromes diarrhéiques chez l'Homme (diarrhées des nourrissons ou des voyageurs) sont dus à des souches de *E. Coli* sécrétant des **entérotoxines** codées par des plasmides. De même, les **bactériocines** sont des polypeptides sécrétés par des Bactéries pour détruire leurs congénères ; elles ont un pouvoir bactéricide puissant sur certaines souches, à la manière des antibiotiques. Le plasmide Col E1, qui fut le premier plasmide connu après le facteur F, code ainsi la **colicine** de *E. Coli*. Les cellules porteuses de ces plasmides particuliers doivent évidemment être protégées contre les toxines qu'elles sécrètent ; elles synthétisent en parallèle des protéines inhibant l'effet de leur propre poison. Tous ces composés interviennent dans les phénomènes de compétition interspécifique et dans la régulation des équilibres au sein des microflores bactériennes.

Le dernier point concerne les fonctions métaboliques liées aux plasmides ; plusieurs caractères biochimiques bactériens sont dus à leur présence : synthèse de pigments, utilisation de métabolites (citrate, lactose, saccharose, urée), ou production de H_2S chez divers genres. Certaines souches sont ainsi capables de dégrader des dérivés d'hydrocarbures (octane, camphre, naphtaline), et s'avèrent très utiles pour nettoyer les méfaits des marées noires. Il faut signaler aussi que les gènes responsables de la fixation de l'azote atmosphérique chez les espèces de *Rhizobium* symbiotiques des légumineuses sont pour la plupart portés par un plasmide de grande taille hébergé par la cellule. Les conséquences planétaires du fonctionnement de ce simple segment d'ADN sont considérables, puisqu'il conduit à la fixation par les plantes de 2.10^8 tonnes d'azote par an, ce qui est bien plus élevé que tous les apports fournis par les engrais azotés ! Une autre Bactérie du sol doit enfin être mentionnée : il s'agit d'*Agrobacterium* (genre proche de *Rhizobium*) qui est responsable de tumeurs végétales en raison de la présence, dans son cytoplasme, d'un grand plasmide dont la particularité remarquable est de pouvoir transférer une partie de son génome à celui de la cellule-hôte.

2. VIRUS

Ce sont des entités biologiques de très petite taille, à structure non cellulaire et ne possédant pas l'ensemble des propriétés attribuées généralement aux êtres vivants. Les Virus ne peuvent se reproduire qu'au sein de cellules vivantes et sont donc des parasites intracellulaires obligatoires ; de ce fait, ils sont le plus souvent pathogènes. En dehors des cellules, ils sont métaboliquement inertes, au même titre qu'un quelconque assemblage macromoléculaire. Les Virus se rapprochent du monde vivant car ils sont constitués des molécules qui en sont caractéristiques, et car ils possèdent un matériel génétique leur permettant de se

reproduire et d'évoluer, mais l'absence de structure cellulaire, de métabolisme et de croissance fait qu'on ne peut les considérer comme des êtres vivants ; ils représentent un **état** dit **acaryote**.

Bien que les maladies virales soient connues depuis l'Antiquité, les agents qui en sont responsables n'ont été clairement identifiés qu'au milieu de notre siècle. Leur découverte, en tant qu'entités infectieuses différentes des Bactéries, date de la fin du XIX[e] siècle, avec les travaux initiés par IVANOWSKI (1892) et BEIJERINCK (1898) sur le Virus de la mosaïque du tabac (VMT), et ceux de TWORT et d'HÉRELLE (1917) sur les Bactériophages. La cristallisation du VMT fut réalisée en 1935 par STANLEY, étape qui ouvrit la voie aux analyses biochimiques précises, grâce à l'utilisation des ultracentrifugeuses développées à la fin des années 30. Enfin, le développement de la microscopie électronique, à partir de 1945, et celui de la multiplication *in vitro* des Virus sur des cellules en culture permit l'explosion des travaux portant sur la morphologie, l'organisation et la physiologie des virions. La figure 15.2 montre des cellules végétales infectées par un virus proche du VMT.

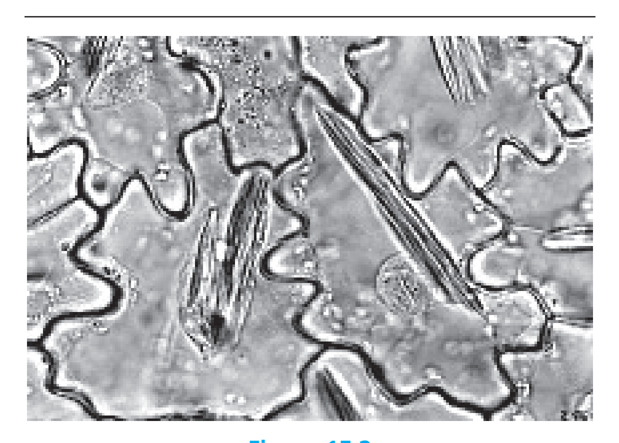


Figure 15.2

Cellules végétales infectées par un Virus à capside hélicoïdale

Ces cellules d'épiderme de Cactus présentent dans leur cytoplasme un énorme fuseau fibreux qui est en fait constitué uniquement de particules virales de 500 nanomètres de long, étroitement accolées les unes aux autres. Ce Virus est proche de celui de la mosaïque du tabac (microscopie photonique ; cliché C. Delay).

2.1. Caractéristiques générales des Virus

Les Virus matures, tels qu'ils existent en dehors des cellules, sont nommés **virions** ou **particules virales** ; ils constituent la forme de dissémination et la forme infectieuse de ces entités. Leur taille, en général très inférieure à celle des Bactéries, s'échelonne, selon les types, de 15 à 250 nm environ. Les plus petits d'entre eux passent à travers les filtres de porcelaine, d'où la terminologie opérationnelle ancienne (la seule définition utilisable avant l'avènement du microscope électronique) de **Virus filtrants**. L'organisation des virions est plus ou moins complexe, en rapport avec cette taille, mais elle reste toujours dans le cadre de l'état acaryote ; les plus gros des Virus (qui sont à la limite de visibilité du microscope photonique) ont la même taille que les Bactéries les plus simples, qui sont pourtant de vraies cellules.

L'étude biochimique des virions est facilitée par le fait qu'à la fin du cycle viral, ils se retrouvent dans le milieu extérieur, soit après la lyse de la cellule, soit après exocytose ; les virions en suspension constituent alors le seul composant particulaire du milieu de culture. Ce matériel étant homogène et ne contenant qu'un nombre limité d'espèces moléculaires différentes (une quinzaine tout au plus, même chez les plus complexes), son analyse par centrifugation analytique et électrophorèse est très simplifiée. En particulier, et c'est un élément de base de leur définition, les virions ne contiennent qu'une seule espèce d'acide nucléique, soit l'ARN, soit l'ADN, mais jamais les deux à la fois. Outre l'acide nucléique qui constitue leur matériel génétique, ils ne possèdent en général pas d'autres macromolécules que des protéines de structure, auxquelles il faut y ajouter, dans certains cas, des phospholipides et polysaccharides (Virus à enveloppe) ; cette règle souffre en fait quelques exceptions que nous signalerons plus loin. Les Virus les plus simples sont constitués d'une seule molécule d'acide nucléique et d'un seul type de protéine, présente en plusieurs milliers de copies identiques (exemple du VMT ; voir plus loin). On comprend, dès à présent, qu'ils ne peuvent pas répondre à la définition des êtres vivants que l'on a donnée dans l'introduction de cet ouvrage.

Les virions ne renferment pas de structure ou de complexe macromoléculaire leur permettant d'assurer les fonctions vitales élémentaires. Ne possédant aucune enzyme du métabolisme intermédiaire ou énergétique, ils ne contiennent aucune petite molécule précurseur et n'ont pas de source d'énergie propre. Ils ne disposent pas non plus de machinerie leur permettant de synthétiser leurs protéines, en particulier les ribosomes. Pour tous les aspects qui relèvent de l'« intendance », dans une

cellule banale, les Virus dépendent donc totalement des activités de l'hôte qui les héberge. Cette simplicité d'organisation et cette incapacité à effectuer tout métabolisme ont pour origine un matériel héréditaire comptant le plus souvent très peu de gènes (voir chapitre 4). Une suspension de virions purifiés est chimiquement inerte, au même titre qu'une solution de sels ou de protéines : aucun échange ne se produit entre eux et leur milieu, aucune activité chimique ne se manifeste. Or, les Virus infectent les organismes et s'y multiplient tout en conservant leurs spécificités morphologiques, immunologiques et pathologiques. La reproduction virale pose donc un problème fondamental.

Les Virus ne peuvent se multiplier qu'au sein de cellules vivantes et sont donc des parasites intracellulaires stricts. Le parasitisme n'est pas propre aux Virus ; on connaît des Bactéries, des Protistes et même des organismes multicellulaires complexes qui dépendent absolument d'un hôte qui les héberge, et qui est plus complexe qu'eux. Cependant, on connaît toujours pour ces formes très particulières d'êtres, des formes voisines au plan systématique, qui sont libres et autonomes, et dont elles ont pu dériver. Même dans le cas des cellules les plus simples (les Mycoplasmes, Bactéries parasites de 200 nm de diamètre), il existe un système propre de synthèse protéique, de réplication du génome, de transcription. Ici, rien de tout cela : c'est le parasitisme absolu ; il y a une discontinuité fondamentale entre un Virus et une cellule, aussi simplifiée soit-elle.

2.2. Organisation des virions

L'analyse morphologique et structurale des Virus est conduite grâce à des méthodes de cytologie électronique telles que la coloration négative et l'ombrage métallique ; ces deux techniques, faciles à mettre en œuvre, sont souvent supérieures à celle des coupes (voir chapitre 3). L'acide nucléique du virion est protégé et enfermé au sein d'une coque protéique appelée **capside** ; celle-ci est constituée d'un grand nombre de sous-unités souvent identiques (ou **capsomères**) dont le nombre et la disposition sont caractéristiques du Virus. L'ensemble forme une **nucléocapside** qui peut rester nue, mais qui est, dans le cas de nombreux Virus de cellules animales (et de quelques Virus de cellules végétales), être entourée par une membrane lipoprotéique dérivée de la membrane plasmique de la cellule-hôte (**enveloppe virale** ; voir plus loin). Le rôle de la capside ou de l'enveloppe est non seulement de protéger l'acide nucléique, mais aussi de permettre au virion de reconnaître sa cellule-cible qui possède pour cela des récepteurs membranaires spécifiques. Nous verrons, à travers plusieurs exemples, que malgré leur extrême simplicité, les Virus sont en effet spécifiques d'hôtes particuliers dans lesquels ils se reproduisent : on parle donc de **système virus-hôte**. Le terme hôte peut recouvrir un type cellulaire donné au sein d'un organisme complexe, puisque certains Virus n'infectent qu'une seule catégorie de cellules sensibles, alors que d'autres attaquent des catégories variées.

L'étude de l'organisation des virions montre qu'il existe un nombre limité de plans structuraux. La forme simple et souvent géométrique de leur nucléocapside permet de les classer en trois groupes principaux, que nous illustrerons chacun par un représentant classique (voir *figure* 14.1) :

- les **virions cylindriques** ou **hélicoïdaux** ; ils sont caractérisés par une nucléocapside simple et allongée, parfois filamenteuse, dans laquelle des protéines entourent l'acide nucléique, tout du long, en formant une sorte de manchon serré ;
- les **virions icosaédriques** ; ils possèdent une coque subsphérique constituée de 20 faces triangulaires jointives dont la taille et l'organisation moléculaire sont plus ou moins complexes ; un nombre toujours limité de protéines entre dans la constitution de ces faces équilatérales ;
- les **Bactériophages complexes** ; ce sont des Virus exclusifs de Bactéries ; ils ont une organisation combinant des aspects des deux types précédents et certains d'entre eux présentent une morphologie très sophistiquée, que nous décrirons plus loin.

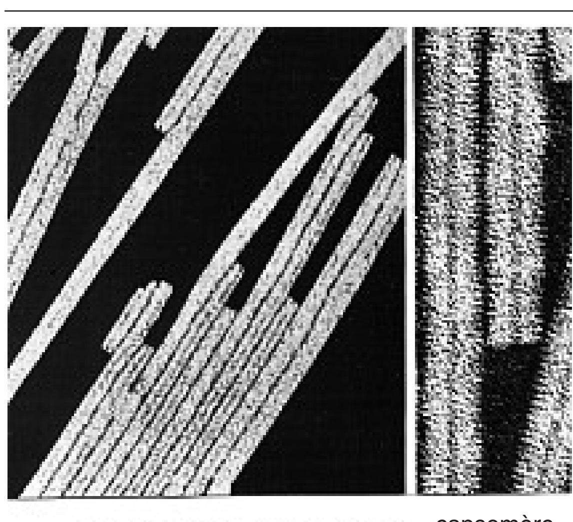
Nous serons également amenés à décrire les **Virus enveloppés**, dont la nucléocapside est icosaédrique ou hélicoïdale, selon les espèces, mais qui diffèrent des précédents par le fait qu'ils possèdent en plus une enveloppe membranaire.

2.2.1. Virus à capside hélicoïdale. Le virus de la mosaïque du Tabac (VMT)

Ce Virus, l'un des plus anciennement étudiés, est responsable d'une maladie du Tabac qui se manifeste par l'apparition de plages de nécrose sur les feuilles ; ces plages, disposées en mosaïque au milieu des tissus sains, gagnent peu à peu tout

le système foliaire, ce qui conduit à un affaiblissement de la plante, voire à sa mort. L'abondance des particules virales dans les cellules infectées permet une récupération rapide de quantités importantes de virions, après un protocole de purification relativement simple. En coloration négative, le virion apparaît comme un bâtonnet cylindrique creux de 17 nm de diamètre sur 300 nm, dont l'organisation est régulière tout du long. L'analyse de sa composition chimique permet de comprendre cette structure très simple ; elle montre en effet l'existence d'une seule molécule d'ARN de 6 395 nucléotides de long, et d'une seule espèce moléculaire de protéine (MM : 17 500 Da), présente en 2 130 copies (voir *figure* 15.3).

Ces deux types de macromolécules s'organisent en une hélice formée de 130 spires jointives ; chaque sous-unité protéique (capsomère) a une forme allongée et s'associe par une de ses extrémités à la molécule d'ARN qui est, elle-même, organisée en hélice. L'ensemble des protéines constitue la capside du virion, l'ensemble capside plus ARN formant une nucléocapside hélicoïdale qui reste nue. L'assemblage d'une structure de grande taille, à partir de deux types d'éléments seulement, pose la question de l'information nécessaire à sa réalisation. Le problème est en fait identique à celui de la mise en place de structures telles que les microfilaments d'actine, les microtubules ou les ribosomes. L'information est contenue dans les sous-unités macromoléculaires elles-mêmes, ce qui se traduit, dans des conditions expérimentales appropriées, par un phénomène d'**autoassemblage** spontané à partir des éléments constitutifs ; le VMT a été le premier matériel sur lequel ce type d'étude a été conduit, et les règles qui en ont été déduites ont un caractère général (voir chapitre 1).



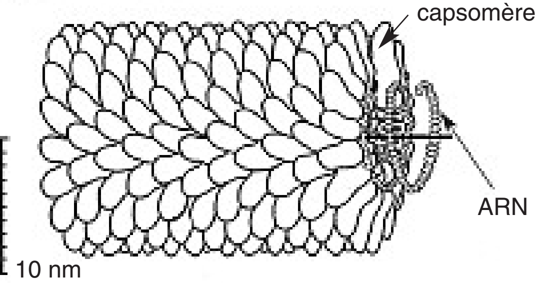


Figure 15.3

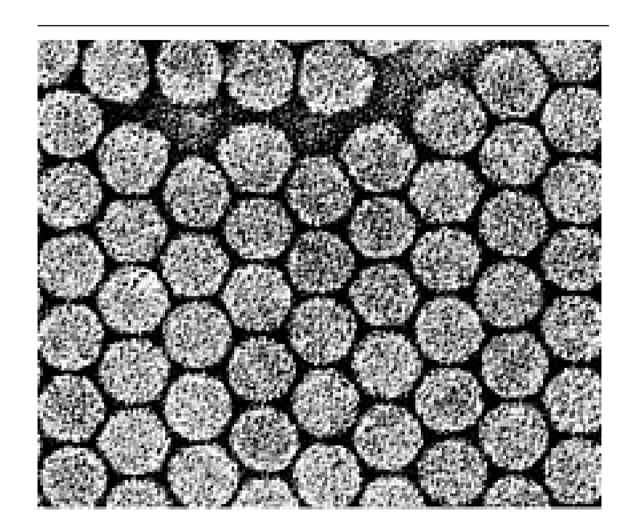
Le Virus de la mosaïque du tabac

Les particules virales sont observées en coloration négative, à deux grossissements différents. Les capsomères, bien visibles à droite, sont représentés sur le schéma qui montre également la structure hélicoïdale de la capside et la molécule centrale d'ARN (cliché Labo. BG).

C'est grâce à cette propriété qu'ont été réalisées les expériences de Fraenkel-Conrat et Williams (1956), sur le matériel génétique du VMT, signalées dans le chapitre 4. À partir des protéines et des ARN purifiés de diverses souches de ce Virus (caractérisées par des symptômes différents), ces auteurs ont reconstitué des virions mixtes rassemblant les composants trouvés dans des souches distinctes. Ils ont ainsi montré que seul l'acide nucléique est porteur d'une information héréditaire ; il a d'ailleurs, à lui seul, un caractère infectieux (bien que réduit par rapport au virion complet).

2.2.2. Virus à capside icosaédrique. Les Adénovirus

Les Adénovirus constituent une vaste famille de Virus de cellules animales ; les premiers représentants ont été extraits de tissus adénoïdes (tels que les amygdales chez l'Homme) de personnes atteintes d'infections respiratoires aiguës. En coloration négative, ils présentent une forme subsphérique qui s'avère être en fait une structure polyédrique à 20 faces en triangle équilatéral et à 12 sommets (icosaèdre). Le diamètre du virion est voisin de 75 nm et, bien que de petite taille, l'organisation de cette particule est sensiblement plus complexe que celle du VMT (voir *figure* 15.4). La capside externe, de nature protéique, protège une molécule d'ADN, elle-même associée à des protéines internes. Pour pouvoir s'organiser en icosaèdre, les unités de structure de la capside sont nécessairement de nature double : certaines, de type pentagonal (les **pentons**) doivent contracter des liens avec



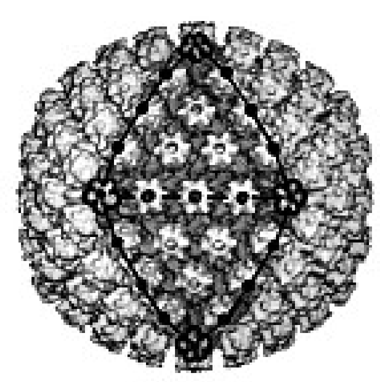


Figure 15.4

Les adénovirus

Les particules virales ont une structure icosaédrique, bien visible sur le cliché du haut, obtenu en coloration négative. L'organisation de la capside, présentée dans le modèle moléculaire, montre sa structure à base de triangles équilatéraux formés ici de 12 hexons, et dont les sommets portent chacun un penton (surlignés).

cinq autres unités de structure, puisqu'elles sont aux sommets du volume ; d'autres, de type hexagonal (les **hexons**) doivent s'associer avec six autres unités, puisqu'elles constituent les faces planes. Il y a donc 12 capsomères de type penton, constitués de cinq sous-unités élémentaires identiques, et 240 de type hexon, formés de trois sous-unités identiques. Sur chaque sommet est fixée une fine fibre surmontée d'une particule globulaire.

2.2.3. Virus enveloppés

Tous parasites de cellules animales, ces Virus présentent une organisation plus complexe que celle des précédents, dans la mesure où leur nucléocapside est entourée d'une membrane classique, c'est-à-dire une bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées des protéines transmembranaires typiques. Cette enveloppe a le plus souvent pour origine la membrane plasmique de la cellule-hôte dans laquelle le cycle de reproduction viral s'est déroulé, et dont elle dérive par un processus de bourgeonnement ; trois exemples classiques sont présentés ici.

• Le **Virus de la grippe**

Le virion, dont le diamètre est de 120 nm environ, porte une enveloppe hérissée d'épines (ou spicules), visibles en microscopie électronique ; il s'agit en fait de deux glycoprotéines transmembranaires : l'**hémagglutinine** et la **neuraminidase**, dont la fonction sera présentée lors de l'étude du cycle du Virus. Étroitement accolée sous la membrane, se trouve située une troisième protéine qui représente la protéine la plus abondante du virion. Dans la cavité limitée par l'enveloppe est située la nucléocapside, constituée d'ARN et d'une protéine capsidale qui l'entoure complètement. Cette nucléocapside, très allongée et qui possède une structure hélicoïdale voisine de celle du VMT, est complètement entortillée au sein du virion. Par électrophorèse, on a montré qu'elle contient 7 ou 8 molécules d'ARN distinctes ; la cohésion de l'ensemble est assurée grâce à la gaine des protéines capsidales. On trouve également sous l'enveloppe plusieurs protéines minoritaires dont les fonctions importantes seront décrites plus loin ; le virion comprend, au total, une dizaine de chaînes polypeptidiques (voir *figure* 15.5).

Il existe trois groupes de virus de la grippe : A, B et C. Les formes A sont responsables des épidémies touchant habituellement l'Homme ; elles infectent aussi divers animaux sauvages ou domestiques : le cheval, le porc, le phoque et de nombreux oiseaux aquatiques, en particulier les canards. La grippe touche régulièrement 5 à 15 % de la population française, faisant plusieurs milliers de morts par an. Les formes B et C, strictement humaines, sont soit responsables d'épidémies locales, soit impliquées dans des syndromes non grippaux.

Tous ces virus ont des **génomes segmentés** (A et B : 8 segments, C : 7), chaque molécule d'ARN (ou chromosome) codant une ou deux protéines. A la différence de certains virus, tels que ceux de la rougeole ou des oreillons, génétiquement très

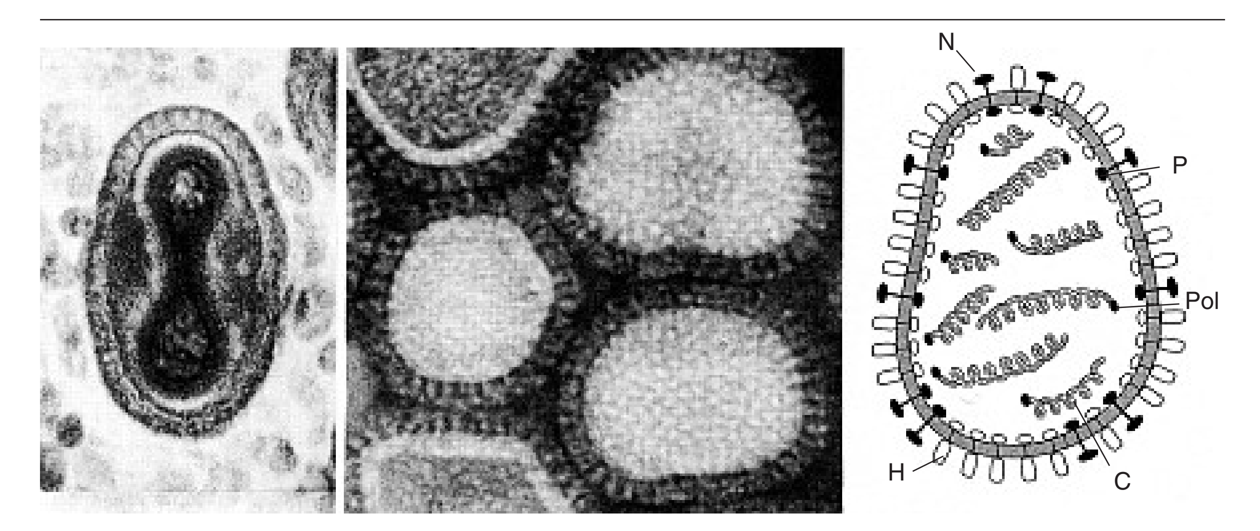


Figure 15.5

Les Virus enveloppés

Ces Virus sont caractérisés par une enveloppe lipoprotéique bien visible sur les clichés (coupe et coloration négative ; Labo BG) ; à gauche : Virus de la vaccine et à droite, Virus de la grippe. Le schéma montre l'organisation du Virus de la grippe : H hémagglutinine, N neuraminidase, P protéine interne, C segment d'ARN recouvert de protéine de capside, avec une molécule de polymérase à son extrémité (8 segments).

stables (la vaccination conférant alors une immunité durable), le virus A de la grippe change en permanence et de nouveaux vaccins doivent être régulièrement préparés. Les raisons de cette situation particulière sont présentées dans l'encart biomédical suivant.

ENCART BIOMÉDICAL

Les causes de la variabilité des virus de la grippe du groupe A

La variabilité phénotypique constante du virus A est due à deux mécanismes génétiques très différents, nommés «glissement» et «cassure» antigéniques. Le premier mécanisme est une variation génétique progressive, due à des mutations ponctuelles fréquentes concernant les deux protéines de surface : l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N) ; ces modifications conduisent à des variations antigéniques mineures. Les épidémies sont limitées, car il existe de grandes ressemblances entre les formes virales qui se succèdent tous les ans ou tous les deux ans ; une immunité croisée étant possible entre elles, les populations sont naturellement protégées par un contact avec les formes antérieures. Cependant, à mesure que les variations s'accumulent (au bout de 2-4 ans), cette protection naturelle s'estompe et la vaccination peut s'imposer.

Les cassures antigéniques sont des changements génétiques profonds et brutaux, survenant tous les 10 ou 20 ans ; elles sont dues à des réassortiments entre «chromosomes», en particulier ceux codant les molécules de H ou de N. Les modifications antigéniques majeures qui en découlent sont responsables de pandémies parfois foudroyantes, car il n'existe pas d'immunité croisée entre formes virales successives, et les populations ne sont pas naturellement protégées. La recombinaison entre segments génétiques issus de souches différentes se réalise dans des cellules ayant été infectées simultanément par les deux virus.

Ce phénomène d' «hybridation» se déroule chez des porcs, qui constituent des réservoirs de virus d'origines variées : oiseaux, humains, etc. Il est admis que les oiseaux sont l'hôte originel des virus de la grippe, dont ils se seraient «échappés» pour passer chez le porc, et enfin chez l'Homme, à la faveur d'un élevage intensif commun, très répandu en Extrême-Orient (le passage d'un hôte à l'autre nécessitant une longue période d'adaptation). L'épisode de la grippe aviaire de 1997 a cependant montré que certaines formes de virus pouvaient passer directement de l'oiseau à l'Homme.

• Le **Virus de la forêt de Semliki**

Il a été isolé de cellules de moustiques de la forêt de Semliki (Ouganda) ; c'est un Virus à ARN dont le plan d'organisation rappelle celui du Virus de la grippe, mais en plus simple. Le virion, qui a un diamètre d'environ 65 nm, possède une enveloppe lipoprotéique dans laquelle on identifie une seule protéine hétérotrimérique formant des spicules pointant vers l'extérieur. La nucléocapside est de type icosaédrique modifié, car c'est un polyèdre régulier à 60 faces (toutes des triangles équilatéraux) ; elle est constituée de 180 molécules d'une même protéine globulaire, qui sont étroitement appliquées à la face interne de la membrane, tandis que la molécule d'ARN (12 700 nucléotides) emplit la cavité du virion. Chaque spicule est associé à une molécule de la nucléocapside, à travers la bicouche lipidique. L'intérêt de ce Virus est que l'on connaît parfaitement les différentes étapes de son cycle, depuis son entrée dans la cellule jusqu'à sa sortie (voir plus loin).

• Le **Virus VIH** (Virus de l'immunodéficience humaine)

Il est responsable d'une maladie, tristement connue, le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), décrit pour la première fois en 1981, et dû à la destruction, par ce Virus, de certains lymphocytes. Il appartient à la catégorie des **Rétrovirus** qui sont caractérisés par une biologie complexe que nous décrirons plus loin. L'organisation du virion (dont la taille est voisine de 100 nm) est classique. Sa membrane phospholipidique contient une protéine transmembranaire glycosylée (dite gp 120) ayant un gros domaine tourné vers l'extérieur ; sous cette membrane est étroitement appliquée une couche de protéines extrinsèques. Le cœur du virion est constitué d'une nucléocapside formée d'une protéine entourant deux copies identiques du même ARN, elles-mêmes recouvertes d'un manchon protéique ; en outre, quelques exemplaires d'une enzyme particulière sont associés à l'ARN : la **transcriptase inverse** du virion, dont nous verrons l'importance pour le déroulement du cycle viral (voir *figure* 15.6).

Dans le cas de certains Virus enveloppés, le bourgeonnement se fait au niveau de membranes internes, dans des compartiments tels que l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. Le trajet de ces Virus est très complexe au sein de la cellule et rappelle celui des protéines sécrétées : ils sont en général émis hors de la cellule par un phénomène d'exocytose (voir chapitre 9). Il faut alors bien comprendre que la membrane qui les entoure provient du compartiment initial où ils ont bourgeonné (éventuellement modifiée au cours du trajet, au sein des cavités traversées), et n'a rien à voir avec la membrane plasmique.

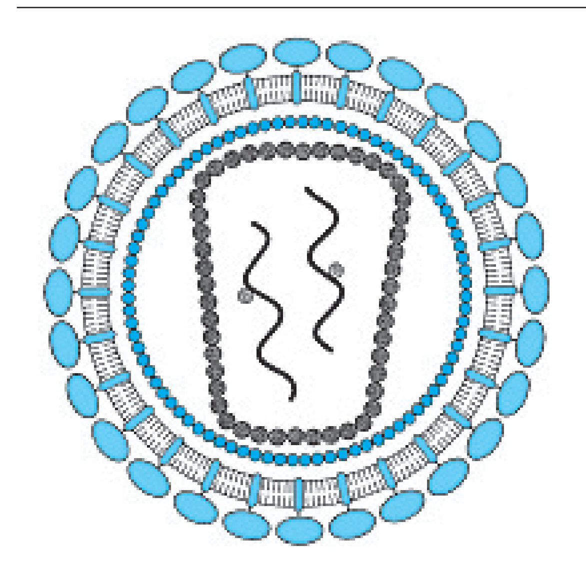


Figure 15.6

Le Virus VIH, responsable du SIDA

Coupe schématique montrant l'organisation du virion du VIH : la membrane phospholipidique porte à l'extérieur la protéine gp120, et sur sa face interne une petite protéine extrinsèque. La nucléocapside contient deux molécules d'ARN identiques, auxquelles sont associées deux molécules de transcriptase inverse (d'après Pour la Science, mars 1997).

2.2.4. Bactériophages complexes

Les **Bactériophages** (ou phages) sont des Virus qui s'attaquent aux Bactéries (Eubactéries et Archébactéries) et les détruisent en général. Ils constituent un groupe hétérogène dont le matériel génétique est constitué d'ADN ou d'ARN. Certains ont une structure simple, icosaédrique ou hélicoïdale, tandis que d'autres sont très complexes. Des phages tels que R 17, MS 2, Qβ, Φx 174, ont une organisation semblable à celle des virions que nous venons d'étudier, de même que les phages dits « impairs » de la série T (T pour type).

Les phages complexes les plus classiques, T2 et T4 (dits « pairs »), ont une forme de têtard, avec une tête qui correspond à la capside, et une queue ayant une structure très élaborée ; la longueur totale de cette particule atteint 0,2 µm. L'intérieur

de la tête, qui a une structure dérivée d'un icosaèdre et est constituée d'une protéine majoritaire, contient une longue molécule d'ADN linéaire, associée à un certain nombre d'autres protéines. La queue est une structure double, formée d'un cylindre creux constitué d'un grand nombre de monomères protéiques identiques, ayant une disposition en anneaux superposés, à l'intérieur duquel se trouve un axe tubulaire. Ce dernier porte, à l'opposé de la tête, une plaque hexagonale munie de longues et très fines fibres caudales ; enfin un anneau plus large (ou col) sépare la tête de la queue (voir *figure* 15.7). Ces virus sont parmi les plus riches en information génétique, et leur fonctionnement, lors de l'infection d'une cellule-hôte, est très complexe.

2.3. Fonctionnement des génomes viraux. Cycles viraux

2.3.1. Les génomes viraux

Mieux que par leur morphologie, relativement peu variée, ou la nature de leurs hôtes – au contraire très divers – les Virus sont efficacement classés selon la nature de leur matériel génétique et la stratégie développée pour l'utiliser. Contrairement aux Procaryotes ou aux Eucaryotes, chez qui celui-ci est toujours constitué d'ADN double-brin, les Virus contiennent un matériel génétique dont la composition et l'organisation sont remarquablement diversifiées : ADN ou ARN, à l'état simple-brin ou double-brin, circulaire ou linéaire, unique ou fragmenté en chromosomes. Les caractéristiques générales de ces génomes ont été présentées dans le chapitre 4 ; dans la mesure où la nature du matériel génétique détermine fortement le type de cycle, les classifications modernes des Virus prennent d'abord ce paramètre en compte (voir *figure* 15.8). Il faut signaler ici que la quasi-totalité des Virus de Végétaux sont à ARN.

• Les **Virus à ADN** représentent le cas le plus simple, car ils utilisent directement la machinerie cellulaire pour accomplir leur cycle, la cellule-hôte ayant toujours un génome d'ADN ; le matériel génétique de la plupart de ces Virus code pour une ADN polymérase propre. Les plus complexes d'entre eux, comme les Bactériophages «pairs» ou le Virus de la Vaccine, possèdent un génome relativement important qui code pour de nombreuses enzymes intervenant spécifiquement dans la réplication et la transcription de leur propre information génétique (mais qu'on ne retrouve pas dans le virion). On connaît quelques rares Virus dont le génome est fait d'un ADN simple-chaîne.

• Chez la plupart des **Virus à ARN positif** (ARNm), le génome est traduit dès son arrivée dans



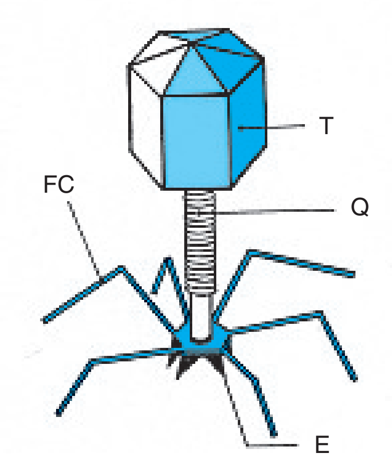


Figure 15.7
Les bactériophages
Deux exemples classiques de bactériophages sont présentés : le bactériophage Lambda, à gauche et le bactériophage T4, à droite. Le schéma montre l'organisation complexe de ce dernier, qui possède un système élaboré de fixation et d'injection de son ADN (contenu dans la tête) dans la cellule bactérienne infectée : T tête, Q queue, E épines, FC fibres caudales. Clichés C. Gordon.

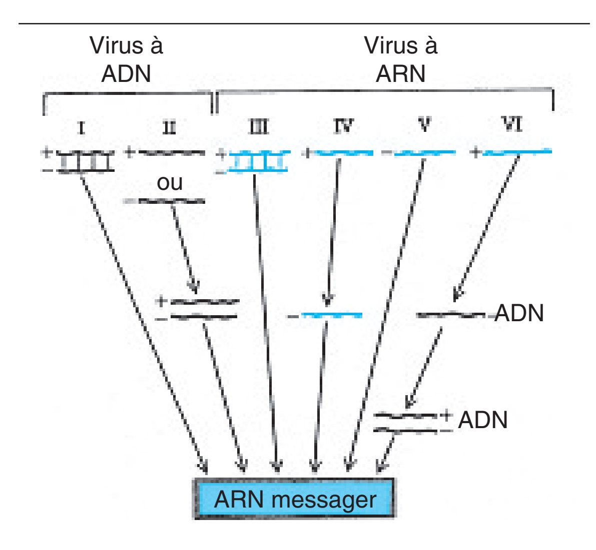


Figure 15.8

Organisation et fonctionnement des génomes des Virus d'animaux

La classification en six familles de ces Virus repose sur la nature chimique, l'organisation de leur matériel génétique et la façon dont l'ARN messager final est obtenu.

la cellule, grâce aux ribosomes hyaloplasmiques ; ceci conduit à la production d'une enzyme spécifiquement virale, nommée **ARN réplicase** (ou ARN polymérase ARN dépendante), capable de répliquer un ARN (obtenir une copie complémentaire d'ARN à partir d'un autre ARN). On obtient ainsi une population d'ARN négatifs permettant de fabriquer à leur tour de nouveaux ARN positifs qui servent à la fois pour la traduction et la constitution des nouveaux virions. Quelques Virus à ARN positif ont un cycle complexe, impliquant la fabrication d'une copie de leur génome sous forme d'une molécule d'ADN double-brin qui sera intégrée dans le génome de l'hôte ; il s'agit des **Rétrovirus**, dont la plupart sont cancérigènes chez les Vertébrés. Ces Virus emportent dans leur virion une enzyme capable de recopier un ARN en ADN, appelée **transcriptase inverse**.

• Tous les **Virus à ARN négatif** (ARN antisens, complémentaire d'un ARNm) ont développé une stratégie très originale : ils emportent nécessairement dans leur capside une enzyme particulière appelée **ARN transcriptase**, dont le fonctionnement est identique à celui d'une ARN réplicase, et qui sert à fabriquer une molécule d'ARN positif à partir de leur génome. Ce dernier ne peut en effet être reconnu par la machinerie cellulaire et traduit en protéines, et une telle enzyme n'existe évidemment pas dans la cellule-hôte. L'ARN positif ainsi obtenu sert d'abord de messager pour la fabrication des protéines virales intervenant dans le cycle ou dans la constitution de la capside, puis, par la suite de matrice pour fabriquer de nouvelles molécules négatives, qui seront encapsidées.

• Les rares **Virus à ARN double-brin** emportent aussi une transcriptase dans leur virion.

2.3.2. Caractères communs aux cycles viraux

Le cycle viral est défini comme la succession des étapes conduisant, après l'infection d'une cellule sensible par une particule virale, à la production d'une nouvelle génération de virions. Ces derniers ne se multiplient pas comme des cellules, par augmentation de taille, puis division ; ils s'assemblent directement et de façon spontanée au sein du cytoplasme à partir de molécules élémentaires (protéines, acide nucléique) fabriquées par la cellule-hôte à partir du génome viral, comme n'importe quel **édifice supramoléculaire** de celle-ci. Malgré la diversité des virus et de leurs cellules-cibles, de leur matériel génétique et des types de cycles rencontrés dans la nature, on peut distinguer une série d'événements communs, due au caractère parasitaire absolu de ces particules infectieuses. Il faut souligner que certains types de virions renferment, en plus de leurs protéines de structure, quelques copies d'une enzyme impliquée dans la réplication de leur matériel génétique ; c'est la seule molécule qu'ils ne peuvent trouver naturellement dans les cellules lors de l'infection, et qui soit cependant indispensable pour démarrer leur cycle ; elle est donc codée par leur propre chromosome. Il existe toujours, au cours du cycle viral, une phase pendant laquelle un Virus est réduit à sa seule information génétique.

• **Reconnaissance et adsorption**

L'infection implique d'abord un contact direct entre le Virus et son hôte ; la particule virale étant inerte, cette rencontre est aléatoire. Celle-ci se réalise facilement dans la nature, dans le cas des cellules bactériennes isolées qui peuvent rencontrer directement des particules virales émises dans le milieu par d'autres cellules lysées. Chez les Animaux, les virions sont amenés dans tous les tissus par les voies respiratoires, sanguines, urinaires, digestives, qui sont autant de portes d'entrée de l'organisme. Les Virus reconnaissent leurs cellules-cibles grâce à des molécules de leur surface (capside ou enveloppe) qui sont identifiées par des

protéines de la membrane plasmique de l'hôte. Ces dernières, qui fonctionnent comme des récepteurs, sont normalement associées à d'autres fonctions cellulaires, mais elles sont en fait détournées par les Virus, qui ont «appris» à les reconnaître. Cette étape de reconnaissance se termine par l'adsorption du virion sur la surface cellulaire ; celui-ci possède, de cette façon, une spécificité pour son hôte que ne présente pas son acide nucléique nu, lequel peut, dans certains cas être infectieux seul. En raison de leur paroi cellulosique protectrice, l'infection des cellules végétales ne peut se faire qu'à l'occasion de blessures ou bien, ce qui est le plus fréquent, lors de piqûres par des Insectes tels que les pucerons qui sont, eux-mêmes, infectés et vecteurs du Virus.

• Pénétration du Virus ou de son matériel génétique

Dans le cas des Virus d'Animaux, il y a soit fusion membranaire (virions enveloppés), soit endocytose et passage par le compartiment endosomal (voir chapitres 6 et 7). La libération de la nucléocapside et du matériel génétique dans le hyaloplasme (**décapsidation**) est donc immédiate, ou bien décalée dans le temps. Chez les Végétaux, il n'y a pratiquement pas de Virus enveloppés et, comme on l'a vu plus haut, l'injection des virions se fait directement dans le cytoplasme. Chez les Bactéries, la situation est encore différente, car la plupart des Bactériophages introduisent, par divers procédés plus ou moins actifs, uniquement leur matériel génétique dans les cellules ; le cas des Bactériophages T2 ou T4, qui fonctionnent comme des seringues à ADN, est tout à fait remarquable.

• Expression et réplication du matériel génétique

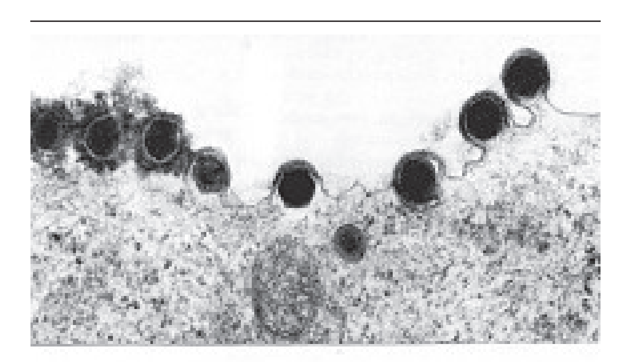
Comme nous l'avons vu, il existe ici de grandes différences en fonction de la nature du matériel génétique viral ; elles sont à la base d'une classification biologique des Virus. Les principaux cas de figure de fonctionnement des génomes viraux seront illustrés par des exemples détaillés.

• Assemblage des particules virales

L'expression du génome viral, qui se réalise au moyen de la machinerie de l'hôte, conduit à la fabrication des protéines du virion (capside, enveloppe et parfois enzymes). De plus, la réplication du génome viral aboutit à la synthèse d'un grand nombre de copies de celui-ci ; des processus d'autoassemblage sont enfin responsables de la réunion de ces deux types de constituants et de la mise en place des nucléocapsides, ou bien des particules virales complètes (cas des Bactériophages, par exemple) au sein du cytoplasme.

• Libération des virions

Cette dernière phase varie selon les organismes. Chez les Bactéries, des enzymes produites en fin de cycle viral détruisent les membranes cellulaires et provoquent la **lyse** de l'hôte, ce qui conduit à la libération des virions dans le milieu. Chez les cellules animales, le mécanisme peut être le même, mais on observe le plus souvent un phénomène de bourgeonnement, à travers la membrane plasmique, qui est à l'origine des Virus à enveloppe ; les protéines membranaires d'origine virale sont mises en place à ce niveau grâce aux mécanismes cellulaires habituellement utilisés pour ce type de protéines (voir *figures* 15.9 et 15.12). En ce qui concerne les Virus de Végétaux, il n'y a pas de sortie spontanée des virions, mais intervention des mécanismes de blessure ou des Insectes.



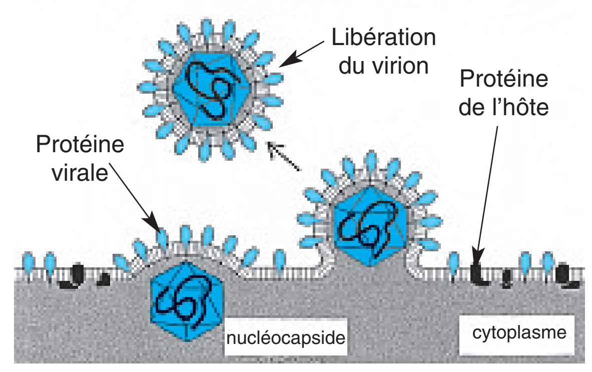


Figure 15.9

Phénomène de bourgeonnement des virions à travers la membrane plasmique

Cliché montrant la formation progressive du virion qui se pince à partir de la membrane plasmique, après que la nucléocapside se soit rapprochée de cette dernière. Le schéma précise l'origine des protéines de l'enveloppe virale, enchâssées dans la bicouche lipidique.

2.3.3. Diversité des cycles des Virus d'Animaux

Chez les Virus de cellules animales, on distingue plusieurs types de cycles conduisant à une production plus ou moins rapide de particules virales et traduisant une forme spécifique d'interaction entre la cellule-hôte et son parasite :

1) l'**infection lytique** : elle conduit très rapidement, après l'infection, à la production et à la libération d'une descendance de nombreux virions, accompagnée de la mort de la cellule, à la suite de sa lyse complète ;
2) l'**infection persistante** : dans ce cas, la cellule-hôte vit en équilibre, pendant des mois, avec son parasite dont le matériel génétique provoque la production lente mais continue de virions qui en sortent, par bourgeonnement, sans endommager sa membrane plasmique.
   Parmi les exemples d'infection persistante, il faut signaler le cas de l'**infection transformante** : dans ce type d'interaction, le matériel génétique du Virus (en général, un Rétrovirus) est intégré au génome de l'hôte et son fonctionnement, ainsi que sa réplication, sont sous le contrôle de ce dernier. Ce phénomène conduit le plus souvent à une transformation néoplasique (cancéreuse) des cellules, c'est-à-dire à leur prolifération continue ; on parle alors de **Virus oncogène**. Pour des raisons diverses, que nous verrons plus loin, le génome viral entraîne un dérèglement des activités cellulaires liées à la division et au contrôle du cycle (voir chapitre 12). La production de virions est la plupart du temps continue, mais elle peut aussi entraîner la lyse des cellules ;
3) l'**infection latente** : les Virus ayant infecté la cellule ne manifestent pas leur présence immédiatement, et ils restent présents dans la cellule pendant des périodes parfois très longues, bien qu'inactifs. Sous l'action d'un stimulus, d'un stress ou d'un affaiblissement de la cellule, le Virus se met à se multiplier et un cycle lytique peut être engagé (les cas du Virus de l'herpès labial ou de la varicelle sont bien connus) ;
4) l'**infection abortive et défective** : ces cycles particuliers sont incomplets car ils ne conduisent pas à la production d'une nouvelle génération de virions. Dans le premier cas, le Virus infecte une cellule qui n'est pas son hôte habituel et il y a incompatibilité entre le génome du Virus et les fonctions de la cellule ; le cycle avorte donc. Dans le deuxième cas, le Virus infecte une cellule normalement sensible, mais celui-ci possède un génome défectueux (car mutant), de sorte qu'une ou plusieurs fonctions ne sont pas remplies et le cycle ne peut s'achever (Virus défectif).

2.4. Quelques exemples de cycles viraux

2.4.1. Cycle de reproduction du bactériophage T4

La multiplication du phage T4 (Virus à ADN double-brin linéaire) se réalise obligatoirement au sein d'une Bactérie-hôte, qui est ici *Escherichia coli* ; étant donné la facilité de culture des Bactéries, l'étude du cycle de ce Virus a été beaucoup plus rapide et complète que celle des Virus des Animaux ou des Végétaux, au moins avant l'avènement des cultures de cellules. La complexité des événements qui se déroulent au cours du cycle viral, ainsi que celle des particules elles-mêmes, s'explique par le fait que le matériel génétique de ce Virus est un des plus importants qui soient (voir chapitre 4). Les analyses de séquences montrent que près de 300 gènes sont présents le long de ce chromosome, ce qui est considérable pour un Virus.

• Adsorption du virion et injection de l'ADN viral : l'infection

L'infection ne peut avoir lieu que si une relation stable s'établit entre les partenaires. La reconnaissance et la fixation du Bactériophage sur la paroi bactérienne sont dues à la présence de molécules situées à l'extrémité des fibres caudales, et qui sont prises en charge par des récepteurs portés par les couches externes de cette paroi. Comme on l'a déjà dit, ces récepteurs ne sont évidemment pas destinés à recevoir les phages ; ce sont des molécules ayant des fonctions bien précises chez la Bactérie (transporteurs membranaires, par exemple). Ces récepteurs sont différents selon les phages.

Une fois le contact établi, le phage se fixe solidement sur la paroi cellulaire grâce à sa plaque caudale terminale ; c'est alors qu'intervient une activité enzymatique portée par la queue du phage, qui dégrade localement la paroi en s'attaquant aux liaisons glycosidiques du peptidoglycane. Les produits de cette dégradation provoquent la contraction apparente de la gaine extérieure de la queue, ce qui entraîne la perforation de la paroi par l'axe tubulaire central qui n'a pas modifié sa longueur. Il ne s'agit pas en fait d'une vraie contraction mais d'un réarrangement des anneaux successifs, dont

le nombre est brutalement diminué de moitié. Simultanément, se produit l'injection dans le cytoplasme bactérien de l'ADN contenu dans la tête du phage, à travers l'axe tubulaire creux (décapsidation) ; on compare parfois ce fonctionnement à celui d'une seringue (voir *figure* 15.10). La particule phagique, dépourvue de son acide nucléique, reste à l'extérieur de la Bactérie et constitue ce qu'on appelle un fantôme qui peut être décroché par une agitation violente. C'est ce phénomène qui est à la base des expériences classiques, évoquées dans le chapitre 4, qui ont permis à Hershey et Chase (1952) de montrer que l'ADN seul constituait le matériel génétique du Bactériophage. Un seul phage infectieux suffit pour déclencher la suite des événements ; d'ailleurs, si trop de phages se fixent sur une seule cellule, sa paroi est tellement endommagée qu'elle éclate et l'ensemble du processus avorte puisque la cellule-hôte meurt.

• Entrée en fonction du génome viral ; synthèse des constituants du virion

Seul l'ADN viral est entré dans la cellule ; le Virus n'existe plus en tant que tel, ni hors de la cellule, ni dedans. Cette période du cycle viral, qui dure environ 10 min, et pendant laquelle aucune unité infectieuse ne peut être mise en évidence est aussi appelée **phase d'éclipse**. Au cours de celle-ci, l'ADN viral utilise les enzymes de transcription et la machinerie traductionnelle de la bactérie pour fabriquer, d'abord ses ARNm propres, puis des protéines qui ont pour rôle de bloquer la transcription et la traduction des ARNm bactériens, de détruire ensuite l'ADN de l'hôte (nucléases), et de permettre enfin la synthèse de bases spécifiques du génome viral, telles que l'hydroxyméthyl-cytosine. On connaît plus d'une trentaine d'enzymes intervenant dans la réplication du Virus, codées par son ADN, et qui sont néosynthétisées. En revanche, les ribosomes, les ARNt, les systèmes de fourniture de métabolites (acides aminés, nucléotides) ou d'énergie sont soigneusement préservés afin de permettre leur utilisation par le Virus. Le résultat de tout ceci est l'asservissement complet de l'ensemble de la machinerie de synthèse bactérienne au profit du seul Virus.

Dans un deuxième temps, l'ensemble des enzymes synthétisées précédemment fonctionne à plein régime et on commence à détecter la présence de composants des futurs virions, même si ceux-ci

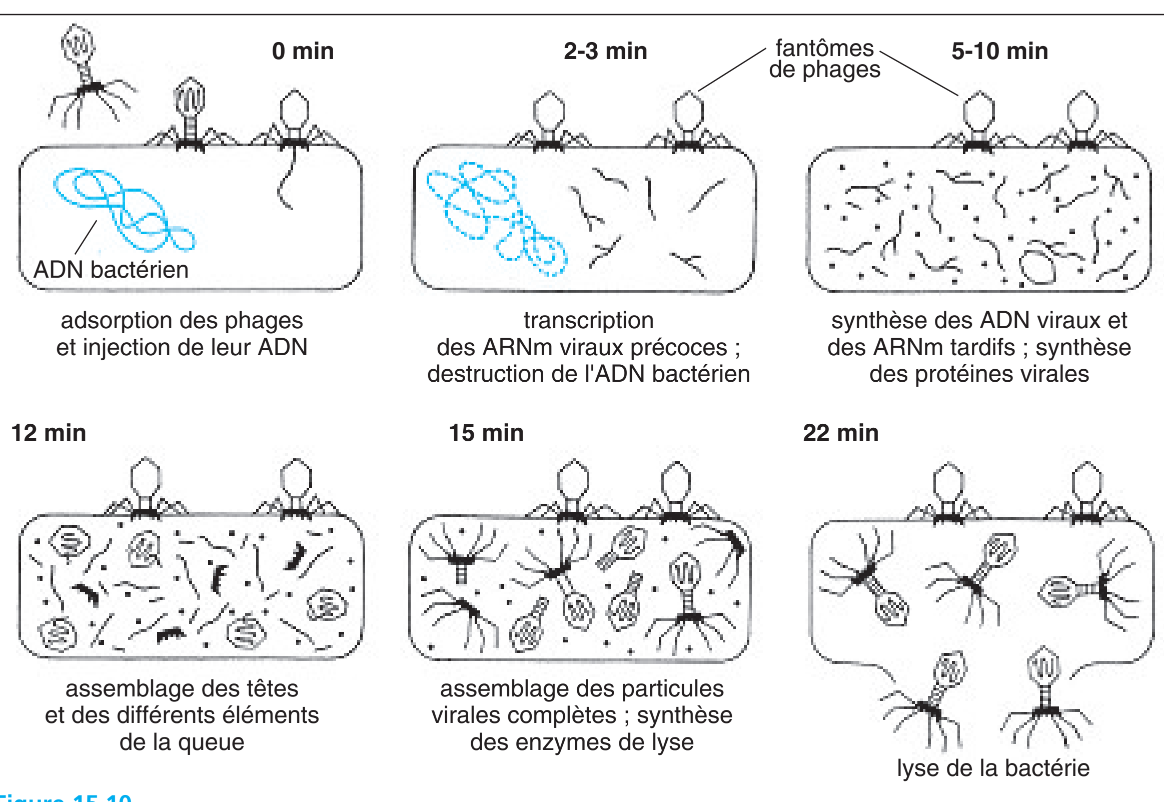


Figure 15.10
Schéma simplifié du cycle lytique du Bactériophage T4

ne sont pas encore fabriqués. Les molécules d'ADN viral sont répliquées à partir de celles initialement injectées dans la Bactérie, grâce aux mécanismes moléculaires habituels, jusqu'à ce qu'environ 200 copies soient accumulées. De façon parallèle, des protéines virales sont fabriquées, parmi lesquelles on peut distinguer deux catégories : 1) les protéines de structure qui permettront l'assemblage de la tête, de la queue et des fibres du virion et, 2) plusieurs protéines spécifiques, que l'on ne retrouve pas dans les virions, et qui ne font pas non plus partie du cortège d'enzymes indispensables au métabolisme du Virus, mais qui interviendront dans la phase finale de libération des particules.

Leur mise en place au sein du cytoplasme commence dès la douzième minute du cycle, mais elles ne sont pas libérées. On ne peut les mettre en évidence que par la microscopie électronique, ou bien en testant le pouvoir infectieux d'extraits bactériens réalisés à ce moment du cycle. Le nombre des virions intracellulaires croît parallèlement à la quantité d'ADN ou de protéines virales. Leur morphogenèse est un processus complexe qui se déroule selon un scénario strict, comme l'ont montré des études utilisant de nombreux mutants déficients pour l'infection. La combinaison des approches génétique et biochimique, l'utilisation de tests *in vitro* a permis de mettre en évidence trois chaînes de montage parallèles : assemblage de la tête, de la queue et des fibres caudales. La réalisation de la tête et l'**encapsidation** de l'ADN dans celle-ci sont des processus relativement tardifs qui mettent en jeu, non seulement des protéines de structure, mais aussi des enzymes de clivage qui découpent les premières ; les têtes et les queues se soudent ensuite spontanément.

• **Libération des virions et lyse de la bactérie**

Cette dernière phase du cycle commence 25 min environ après l'infection, et se manifeste par la présence de virions libres dans le surnageant de la culture infectée. Lorsque la majorité des protéines capsidales et de l'ADN s'est organisée pour donner 150 à 200 particules virales, la paroi bactérienne est rompue et les virions sont libérés en quelques secondes. La raison de ce phénomène est la présence, au sein du cytoplasme, d'une grande quantité d'une enzyme, codée par le génome viral et fabriquée dans la phase tardive, nommée lysozyme ou **endolysine**. Celle-ci attaque le peptidoglycane de la paroi, la fragilise et conduit à l'éclatement de la cellule par choc osmotique (d'autres enzymes interviennent pour dégrader la membrane plasmique). Cette molécule est identique à celle qui, fixée à la plaque caudale du phage, permet l'injection de l'axe tubulaire lors de l'infection. La phase finale du cycle est la lyse de la bactérie qui était déjà potentiellement morte depuis longtemps, son ADN étant détruit ; on parle de **cycle lytique** et de **phage virulent**.

COMMENTAIRE

Notions de cycle lysogène et de provirus

Si la production d'une descendance et la lyse sont l'unique façon dont se conclut une infection par un Bactériophage T4, il faut savoir que ce n'est pas la seule issue possible pour de nombreux autres phages, dont le plus connu est le **Bactériophage Lambda**, qui est un peu plus petit que le précédent. Ces Virus présentent une biologie complexe dans laquelle deux types de cycles coexistent. En effet, le cycle lytique classique est parfois remplacé par un événement à la suite duquel le phage ne produit pas de descendance, mais entre dans un état tel qu'il ne se manifeste plus (latence). On montre que le génome viral est toujours présent dans la cellule, mais sous une forme inactive. Il existe en fait à l'état intégré dans le chromosome de l'hôte, en un point bien particulier ; on parle alors de **lysogénie** et de **cycle lysogène**. Le génome viral est alors répliqué en même temps que le chromosome bactérien et il se perpétue de génération en génération. Étant mis sous le contrôle du génome de l'hôte, il n'exprime pas les fonctions lytiques et ne conduit pas à la production de virions.

Cet état stable peut se maintenir très longtemps, mais peut aussi être rompu brutalement sous l'action de certains facteurs externes qui affaiblissent les cellules (les UV, par exemple), et une phase lytique est alors engagée. On appelle **prophage** (ou plus généralement **provirus**) la forme intégrée du génome viral, et l'on parle de **phage tempéré** pour désigner ce type de Virus. Les mécanismes mis en jeu pour engager et maintenir l'état lysogène, ou pour faire basculer d'un cycle dans l'autre, sont d'une telle complexité qu'ils ne peuvent être décrits ici. Le phénomène d'intégration du génome viral, initialement linéaire, implique tout d'abord qu'il soit circularisé grâce à une ligase, puis qu'il soit recombiné avec l'ADN bactérien grâce à une enzyme particulière, nommée **intégrase**.

2.4.2. Cycle de reproduction du Virus de la grippe

La reproduction de ce Virus enveloppé se fait, chez l'Homme, au niveau de l'épithélium bronchique, qui ne constitue évidemment pas un système biologique aisé à manipuler. Son cycle de multiplication a pu être analysé de façon plus simple grâce à l'utilisation d'un système de cellules en culture ; les principales étapes de ce cycle rappellent celles décrites chez le Bactériophage.

• Adsorption et pénétration du génome viral

L'hémagglutinine contenue dans l'enveloppe du virion reconnaît des résidus glycosidiques spécifiques (acides sialiques) portés par diverses molécules de la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires. Cette protéine doit son nom au fait qu'elle est capable, comme le font certains anticorps, d'agglutiner les hématies en réalisant des pontages entre leurs membranes. Lorsque que le virion est reconnu par les récepteurs d'une cellule-cible, il se fixe à sa surface, ce qui entraîne immédiatement un phénomène de fusion entre les deux membranes, puis la libération de la nucléocapside dans le hyaloplasme. Ce mécanisme de pénétration du matériel génétique est beaucoup plus simple que celui décrit pour le Bactériophage, mais on notera tout de même que l'adsorption est, ici aussi, un processus hautement spécifique.

• Synthèse des constituants du virion

Le matériel génétique du Virus est un ARN négatif ; nous avons vu plus haut que les virions de cette catégorie contiennent une ARN transcriptase, représentée ici par les composants polypeptidiques mineurs de la nucléocapside. La première étape cruciale du cycle viral est donc la transcription de l'ARN viral en un ARNm utilisable par les ribosomes de la cellule pour fabriquer des protéines virales, et en particulier la transcriptase. Celle-ci fonctionne aussi comme réplicase et permet de réobtenir des brins négatifs à partir de brins positifs. De cette façon, le système s'amplifie et la cellule fabrique un grand nombre de brins des deux signes, ce qui conduit à la production simultanée de tous les constituants du virion : ARN négatif, protéines de capside et transcriptase encapsidée.

Cette description simplifiée ne doit pas faire oublier que le génome viral ne se comporte pas comme une seule entité, puisqu'il contient 8 molécules distinctes d'ARN. Il est intéressant de noter qu'il y a à peu près autant de protéines intervenant dans le cycle de ce Virus que de segments d'ARN, et qu'il existe une bonne correspondance entre leurs tailles. Chaque segment d'ARN du génome correspond à un gène unique, codant un seul ARNm ; en fait, certains d'entre eux codent pour deux protéines, car ils sont localement traduits dans deux cadres de lecture différents (gènes chevauchants). On peut parler ici de chromosomes ne contenant qu'un seul gène ; ce **génome** est dit **segmenté** ou morcelé. Cette caractéristique génétique remarquable se retrouve dans un autre groupe de Virus d'Animaux, à génome d'ARN double-brin, nommés Réovirus.

• Assemblage des virions et libération par bourgeonnement

La morphogenèse du virion se réalise en deux étapes : l'assemblage de la nucléocapside et son incorporation dans l'enveloppe issue de la membrane plasmique. La nucléocapside s'assemble dans le noyau, d'où elle migre ensuite vers le cytoplasme périphérique. De nombreuses questions se posent au sujet de sa mise en place : comment ses éléments constitutifs (ARN et protéines), fabriqués dans le hyaloplasme, entrent-ils dans le noyau, et comment en sort-elle ensuite ? comment sont rassemblés en une seule unité les 8 segments distincts d'ARN constituant le génome viral ?

D'après ce que l'on sait sur d'autres Virus, les protéines de l'enveloppe sont fabriquées sur les ribosomes liés au réticulum endoplasmique rugueux et dirigées vers la membrane plasmique selon des mécanismes identiques à ceux décrits pour les protéines membranaires normales (voir plus loin et chapitre 9). Après exocytose, l'hémagglutinine et la neuraminidase se rassemblent au niveau de certains endroits de la membrane plasmique et forment des sortes de taches ; les nucléocapsides reconnaissent ces structures grâce à des interactions entre protéines. Il s'en suit un bourgeonnement de la membrane plasmique qui englobe peu à peu la nucléocapside ; on obtient ainsi un virion complet, avec son enveloppe indépendante, qui reste un moment associé à la cellule.

La production des particules infectieuses se fait ici sans destruction de la cellule qui continue à vivre. Le rôle de la neuraminidase de l'enveloppe est de permettre la libération complète des virions dans le milieu extracellulaire en supprimant la relation entre hémagglutinine et protéines de la surface cellulaire : l'enzyme rend inefficaces les récepteurs du Virus en décrochant les résidus glucidiques de ces glycoprotéines.

2.4.3. Cycle de reproduction du Virus du SIDA (VIH)

Ce Virus appartient à la catégorie des **Rétrovirus** qui sont des Virus enveloppés à génome d'ARN, et qui provoquent en général des cancers chez les Animaux (Virus oncogènes ; infection transformante). Parmi eux, le Virus VIH, responsable du SIDA, constitue une exception car il ne provoque pas directement de cancer mais exerce son action en tuant spécifiquement certaines catégories de lymphocytes intervenant dans l'immunité. Le terme de Rétrovirus vient du fait que ces Virus inversent le processus normal au cours duquel l'information génétique, constituée d'ADN chez toutes les cellules, est transcrite en ARN pour être exprimée. En fait, chez ces Virus, les chaînes infectieuses sont constituées d'un ARN positif, mais une enzyme encapsidée propre à ce groupe : la **transcriptase inverse**, convertit cette information en ADN double-brin qui est ensuite intégré dans le génome de la cellule-hôte. Cette situation est semblable au phénomène de lysogénie décrit pour le phage Lambda, et on parle aussi de **provirus** pour cet ADN intégré.

De façon générale, les Virus qui sont cancérigènes rendent les cellules immortelles car la présence d'ADN viral dans leur génome entraîne la synthèse de protéines surnuméraires susceptibles de perturber les contrôles intervenant dans les phénomènes de prolifération. Dans le cas des Rétrovirus, les gènes viraux responsables de la tumorisation sont des copies modifiées de gènes cellulaires normaux, qu'ils ont emportées en les «volant» aux cellules-hôtes dans lesquelles ils ont séjourné au cours de cycles précédents, et qu'ils introduisent dans une autre cellule, lors d'une nouvelle infection. La présence de ces copies mutantes surnuméraires, qui s'expriment dans les cellules, provoque de nombreuses dérégulations de leurs activités. Il faut signaler que la plupart des gènes intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire (**proto-oncogènes**) ont été découverts sous la forme d'**oncogènes** véhiculés par les génomes des Rétrovirus (voir chapitre 13). Certains provirus peuvent aussi perturber le fonctionnement normal des cellules en se logeant, par hasard, au sein des régions de contrôle de gènes importants tels que les proto-oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeurs (effet mutagène).

Il existe aussi des Virus oncogènes à ADN, dont le matériel génétique est capable de s'intégrer dans les chromosomes de l'hôte, mais dans ce cas ce sont des gènes proprement viraux qui stimulent la prolifération continue des cellules.

Le cycle de vie simplifié d'un Rétrovirus est résumé dans la *figure* 15.11. La pénétration du virion s'effectue de façon classique : par endocytose ou fusion membranaire ; lorsque l'ARN viral est libéré dans le hyaloplasme, il l'est en même temps que la transcriptase inverse qui avait été encapsidée avec lui. Cette ADN polymérase inhabituelle utilise aussi bien l'ARN que l'ADN comme matrice pour synthétiser de l'ADN ; elle commence à fabriquer un hybride ADN/ARN qui est ensuite utilisé pour faire un ADN double-brin normal. Cette copie du message contenu dans l'ARN initial se circularise, comme le fait le génome du phage Lambda, puis s'intègre en un endroit quelconque d'un chromosome de l'hôte grâce à l'intervention d'une protéine de recombinaison spécifique (une **intégrase**) codée et encapsidée, comme la transcriptase, par le génome viral. C'est seulement après son intégration que s'effectue l'expression de ce dernier ; celle-ci obéit aux règles habituelles, c'est-à-dire qu'elle implique la synthèse d'ARNm (grâce à l'ARN polymérase II cellulaire), puis de protéines virales. C'est ainsi que se fabriquent en abondance les composants des virions (ARN, protéines d'enveloppe et de capside, transcriptase inverse et intégrase) qui s'assemblent et bourgeonnent à la surface de la cellule.

Encart biomédical

Virus VIH et SIDA

Quel est le mode d'action spécifique du Virus VIH chez l'Homme ? Ce Virus attaque une classe précise de cellules sanguines, les lymphocytes T4 (dits auxiliaires), chez qui il accomplit son cycle ; les lymphocytes dits T8 ou B sont épargnés. Cette reconnaissance étroite tient au fait que les cellules T4 possèdent à leur surface une protéine membranaire (dite CD4) qui se comporte comme un récepteur du Virus. On rencontre à nouveau ici cette notion importante de spécificité liée à des récepteurs, dont on a parlé dès l'étude du système Bactériophage T2/Bactérie. Comme beaucoup de Rétrovirus cancérigènes, qui ne tuent pas les cellules qui les hébergent lorsqu'ils bourgeonnent à leur surface (ce qui serait incompatible avec la prolifération), le Virus du SIDA ne détruit pas directement son hôte. C'est l'activation du système immunitaire qui conduit à la

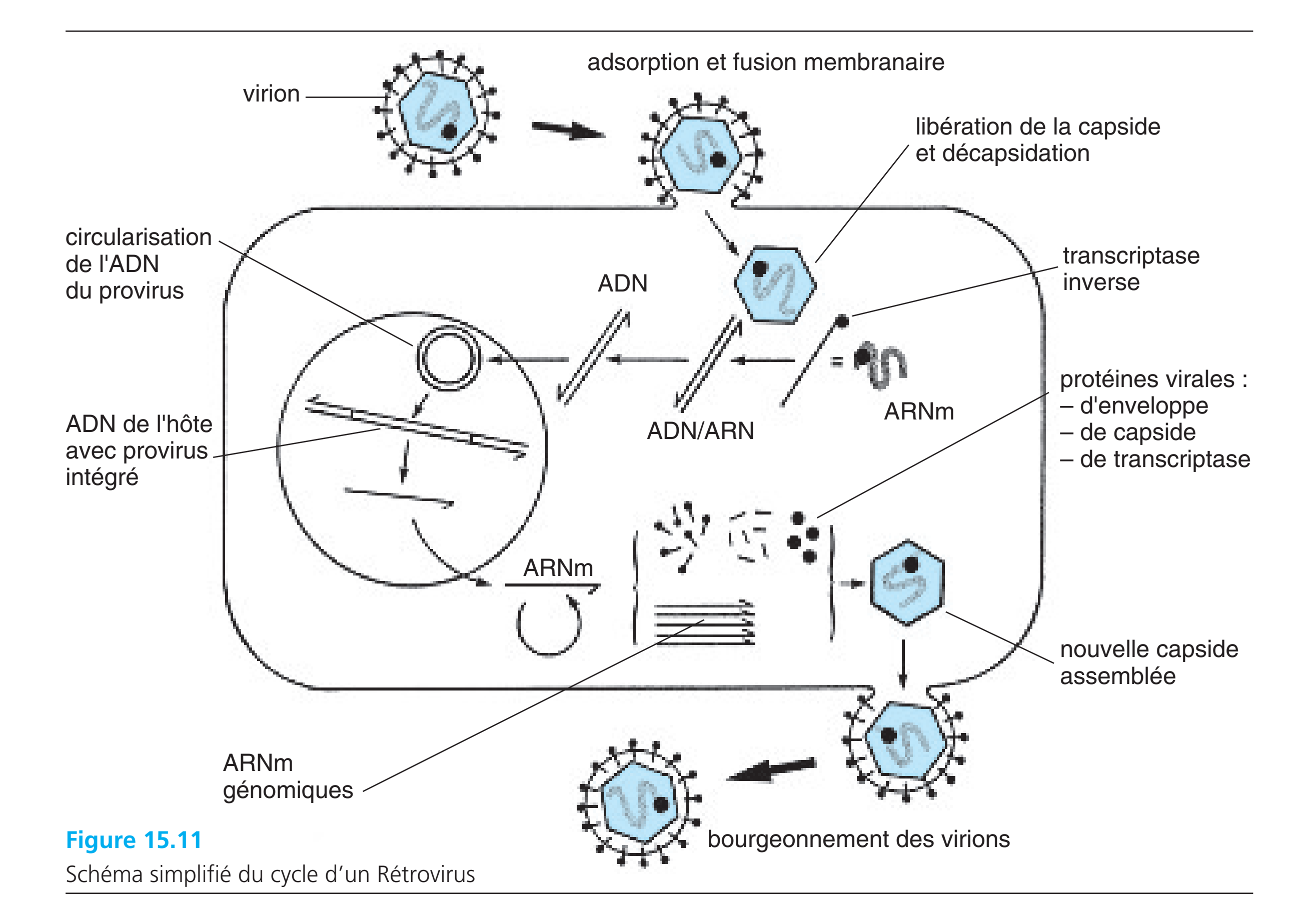


Figure 15.11
Schéma simplifié du cycle d'un Rétrovirus

destruction des lymphocytes infectés. La conséquence de ceci est grave car les lymphocytes de cette classe sont au cœur d'un réseau dense d'interactions avec les autres cellules immunitaires : ils sécrètent en effet des médiateurs chimiques (les lymphokines, dont l'interleukine 2 ; voir chapitre 13) qui stimulent leurs fonctions. En leur absence, les lymphocytes B ne sont plus activés à produire des anticorps circulants, les cellules T8 (dites cytotoxiques) ne détruisent plus les cellules infectées par des Virus, et les macrophages ne sont plus stimulés à phagocyter les Bactéries. En fin de compte, les individus atteints manifestent une immunodéficience profonde qui laisse la porte ouverte à toutes sortes d'**infections opportunistes** et à certains cancers comme le Sarcome de Kaposi. Ces maladies sont dites opportunistes car elles ne sont pas en soi très graves, mais elles le deviennent chez des personnes dont le système immunitaire est déprimé ; il s'agit de pneumonies, méningites, encéphalites, infections de l'œsophage, de l'intestin ou de la peau, dues à des parasites variés : Virus, Bactéries, Champignons et Protistes.

3. VIRUS ET PLASMIDES COMME MODÈLES D'ÉTUDE ET OUTILS EN BIOLOGIE

Les Virus détournent et utilisent, pour leur reproduction, l'ensemble de la machinerie de la cellule-hôte, aussi bien en ce qui concerne la réplication et la transcription de leur génome que pour sa traduction en protéines. Pour pouvoir être déchiffré, ce dernier doit donc présenter des caractéristiques générales identiques à celles du matériel génétique de la cellule-hôte (Procaryotique ou Eucaryotique), c'est-à-dire une organisation continue ou discontinue des gènes, et des signaux spécifiques de démarrage et de terminaison des divers processus qu'on vient de rappeler. C'est à ce titre que les Virus constituent des outils privilégiés pour l'analyse expérimentale de nombreux phénomènes moléculaires et cellulaires : processus d'autoassemblage, mécanismes fondamentaux de la réplication et de l'expression du génome, trans-

port intracellulaire des protéines et biogenèse des membranes, etc. Ils sont également très utilisés en génie génétique, comme vecteurs de clonage ou d'expression.

3.1. Les Virus comme modèles d'étude en biologie cellulaire et moléculaire

3.1.1. Étude de la synthèse et du routage des protéines ; l'exemple du Virus de la forêt de Semliki

Lors d'une infection virale, la majorité des protéines fabriquées est commandée par le génome du Virus, qui prend le dessus dans la cellule en inhibant les processus endogènes. Au lieu de synthétiser simultanément des milliers de molécules différentes (et en petite quantité chacune), comme elle le fait de façon normale, la cellule n'en fabrique plus qu'un nombre limité (quatre, dans ce cas précis), en grande quantité. De plus, comme le synchronisme des événements est obtenu par l'infection des cellules *in vitro*, l'étude expérimentale des mécanismes est très simplifiée et les conclusions faciles à tirer. L'exemple classique du cycle de reproduction du Virus de la forêt de Semliki, qui a été analysé en détail dans les années 80, permet de comprendre quel peut être l'apport d'un modèle viral à la connaissance de la synthèse et du routage des protéines cellulaires elles-mêmes (voir chapitre 9). L'étude de ce cycle a été facilitée par l'utilisation d'un modèle simplifié de cellule-hôte : les cellules en culture de rein de hamster (plus faciles à manipuler que les moustiques des forêts ougandaises) ; voir la *figure* 15.12.

Les spicules glycoprotéiques de l'enveloppe sont reconnus par des récepteurs membranaires de la cellule-hôte qui les fixent, et les virions sont entraînés vers des puits recouverts de clathrine (voir chapitre 6). Les vésicules qui en sont issues après endocytose emportent chacune un virion ; elles rejoignent des vésicules du compartiment endosomal dont le contenu acide provoque la fusion des deux bicouches lipidiques. La nucléocapside est alors expulsée de l'endosome (décapsidation) et se trouve maintenant dans le hyaloplasme où l'expression du génome viral (ARN positif) peut commencer ; une fois débar-

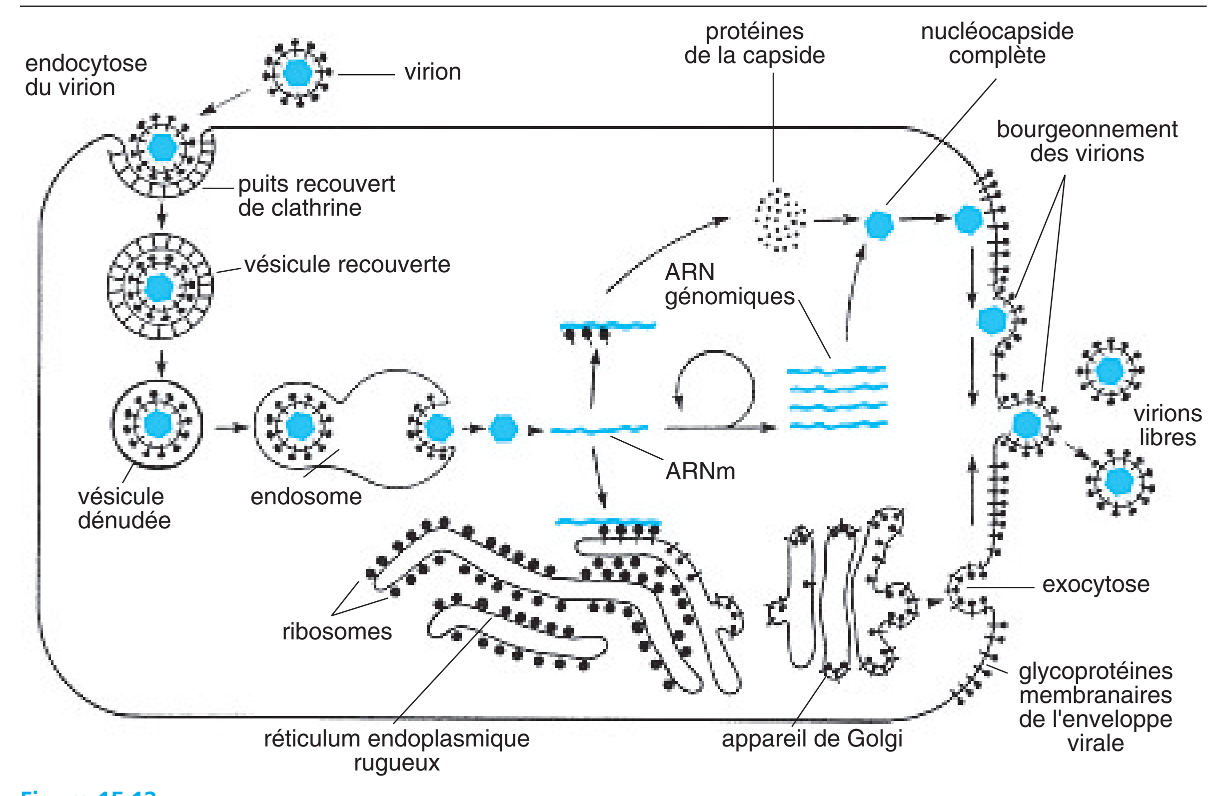


Figure 15.12

Schéma simplifié du cycle du Virus de la forêt de Semliki (d'après Alberts et *al.*, *Biologie Moléculaire de la cellule*).

rassé de ses protéines capsidales, cet ARNm est directement utilisé par les ribosomes cellulaires. La première protéine importante fabriquée est une ARN réplicase, dont la cellule est évidemment dépourvue, et qui a la capacité à reproduire le génome viral. À partir de la molécule initiale, plusieurs molécules complémentaires sont ainsi fabriquées, qui servent à leur tour de matrices pour refabriquer des copies positives. Ce système d'amplification, semblable à celui décrit pour le Virus de la grippe, permet une synthèse de plus en plus grande de molécules d'ARN et de protéines d'origine virale. Grâce à l'emploi de précurseurs radioactifs, deux types de transcrits ont été mis en évidence : des transcrits courts qui servent à fabriquer la majorité des protéines virales (26 S), et des molécules complètes (42 S) qui serviront de génomes pour les futurs virions.

En utilisant des systèmes reconstitués *in vitro*, contenant des ARNm 26 S purifiés, des ribosomes et des vésicules microsomales (voir chapitre 9), on a montré que la traduction des transcrits courts est un processus complexe. Celui-ci conduit simultanément à la synthèse d'une protéine qui restera dans le hyaloplasme, et à celle de trois autres protéines (formant les spicules) qui empruntent la voie du réticulum rugueux et deviennent des protéines intrinsèques de ce dernier. Cette approche a permis de découvrir l'existence d'une **séquence-signal d'adressage** interne au polypeptide, située après la protéine qui deviendra hyaloplasmique, et qui dirige les ribosomes en cours de traduction vers le réticulum rugueux. Le résultat de cette opération complexe est que les spicules viraux sont mis en place dans le réticulum, où ils sont tournés vers la cavité, puis ils passent à travers l'appareil de Golgi, où ils sont glycosylés ; ils se retrouvent enfin, après exocytose, ancrés dans la membrane plasmique, et tournés vers l'extérieur de la cellule.

La suite du processus précise ce qui a été dit pour le virus grippal ; 180 exemplaires de l'unique protéine hyaloplasmique s'associent à un ARN 42 S pour former une nucléocapside. Cette protéine reconnaît ensuite la base des spicules tournée vers le hyaloplasme, et le processus de bourgeonnement est amorcé. Quand chacune des 180 molécules de capside a fixé une protéine de l'enveloppe, la membrane cellulaire a entièrement recouvert la particule et le virion est terminé : il se détache alors de la cellule et est libéré dans le milieu. Comme pour tous les Virus à enveloppe, on comprend ainsi pourquoi les lipides de celle-ci ont la même composition que ceux de la membrane plasmique, et comment les protéines cellulaires sont exclues du virion. Des résultats semblables sur la mise en place des glycoprotéines de surface ont été obtenus avec le Virus de la grippe et le Virus de la stomatite vésiculaire (VSV).

3.1.2. Étude du matériel génétique et de son expression

Il n'est pas possible de décrire ici dans le détail tous les problèmes de biologie moléculaire que les systèmes viraux ont permis d'aborder avec succès ; nous en rappellerons seulement quelques exemples significatifs. Les expériences historiques de Hershey et Chase, puis de Fraenkel-Conrat, qui ont permis d'identifier la nature chimique du matériel génétique du Bactériophage T4 et du VMT, ont fait entrer la virologie dans l'ère de la biologie moderne. C'est aussi l'étude du Bactériophage T2 qui a mis, entre autres, les chercheurs sur la piste du concept d'ARNm (voir chapitre 4), et c'est grâce aux Virus à génome d'ARN positif que l'on a pu disposer de sources abondantes d'ARNm pour tester les systèmes de traduction *in vitro* et analyser le processus de synthèse des protéines. De même, les petits Virus à ADN double-brin circulaire de Bactéries ou d'Eucaryotes ont permis d'élucider les mécanismes enzymatiques de la réplication, dans la mesure où ils utilisent uniquement les protéines de l'hôte ; l'identification et la purification de celles-ci ont à nouveau pu être réalisées grâce à des systèmes *in vitro*. L'étude de l'établissement et du contrôle de la lysogénie a constitué un volet capital dans la compréhension de la régulation de l'expression des gènes et du mode d'action des répresseurs.

Plus récemment, c'est l'analyse de l'organisation et du fonctionnement des gènes de certains Virus de cellules animales qui a conduit à la découverte de la structure discontinue (morcelée) des gènes eucaryotiques. La mise en évidence des propriétés extraordinaires des Rétrovirus, par rapport au dogme central de la biologie moléculaire, a révolutionné les idées courantes et a ouvert la voie à une conception d'un génome plus fluide que ce que l'on croyait jusque-là. Enfin, comme on l'a rappelé plus haut, c'est l'étude de ces mêmes Rétrovirus, véhiculant des oncogènes variés, qui a permis de déchiffrer les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.

3.2. Intérêt des plasmides en génie génétique

Depuis une vingtaine d'années, les plasmides représentent un outil de base en génie génétique pour les raisons suivantes :

– ils constituent des entités autoréplicatives ;
– ils sont en général faciles à purifier et à manipuler, grâce à leur petite taille ;
– ils peuvent véhiculer des segments d'ADN étranger que l'on a intégrés dans leur séquence, grâce aux techniques de recombinaison de l'ADN *in vitro* ;
– ils peuvent être introduits artificiellement dans des cellules réceptrices qui en sont dépourvues, bactériennes ou eucaryotiques (levures, cellules animales ou végétales), par des protocoles dits de **transformation** ou de **transfection** ;
– il est possible de sélectionner aisément les cellules transformées et possédant des plasmides recombinés grâce aux résistances aux antibiotiques qu'ils confèrent aux cellules-hôtes, par exemple.

Les plasmides sont largement utilisés comme **vecteurs de clonage** de segments d'ADN quelconques (que l'on amplifie ainsi à volonté), ou comme **vecteurs d'expression**, lorsque les gènes clonés peuvent fonctionner dans les cellules-hôtes (permettant l'expression de protéines eucaryotiques chez les Bactéries, par exemple). Il faut préciser que les plasmides utilisés en laboratoire sont totalement artificiels, et fabriqués de toutes pièces à partir de fragments d'ADN d'origines diverses (ADN plasmidiques, viraux ou chromosomiques) ; ils sont construits «sur mesure» en fonction des besoins de leurs utilisateurs. De même, de nombreux Virus ont été adaptés pour le génie génétique et certains d'entre eux (les Adénovirus, par exemple), après avoir été «désarmés», autorisent déjà des expériences de **thérapie génique** chez l'Homme.

4. LES PRIONS : DES AGENTS INFECTIEUX NON CONVENTIONNELS

Avec les **prions**, on aborde une des énigmes récentes de la biologie ; il s'agit d'entités infectieuses fondamentalement différentes de toutes celles classiquement décrites : Protistes, Bactéries, Virus, etc. Pendant longtemps, les maladies liées à ces agents ont été attribuées à des «Virus lents», mais on n'a jamais pu isoler de virions ou de matériel génétique de taille suffisante, propre à ces entités infectieuses. Nous verrons qu'il s'agit de simples protéines, hautement nocives, et qui ont la propriété remarquable de s'auto-amplifier, le mot reproduire ne pouvant pas être utilisé en la circonstance.

Encart biomédical

L'affaire des «vaches folles» et la transmission des prions à l'Homme

Chez l'animal, la transmission de ces particules infectieuses à partir d'un hôte infecté est assurée naturellement par la voie digestive. Cette transmission franchit la barrière d'espèce puisqu'on a montré que des espèces telles que le Chat, le Vison, le Cerf, la Vache, le Guépard, ont été contaminées à la suite de leur alimentation régulière avec des farines fabriquées à partir de carcasses et d'abats de moutons contaminés, et incorrectement préparées. On pense que la protéine PrPrés ingérée pourrait remonter le long des fibres nerveuses innervant le tube digestif, vers le système nerveux central, après avoir été capturée par elles. L'encéphalopathie bovine (ESB) est apparue en Grande-Bretagne en 1986 et a rapidement touché tout le cheptel de ce pays. Plusieurs centaines de milliers d'animaux ont été abattus ; la durée d'incubation chez la Vache est de 5 à 6 ans.
Chez l'Homme, il est désormais certain, à la suite du décès d'une centaine de personnes jeunes au Royaume-Uni essentiellement, atteintes d'une forme atypique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, que la «maladie des vaches folles» leur a été transmise à la suite de la consommation de viande contaminée. Par ailleurs, la transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob a été effectuée chez l'Homme, de façon accidentelle dans les années 80, à la suite de greffes de cornée ou de l'administration d'hormones hypophysaires préparées à partir d'hypophyses d'individus malades. Le gène de la protéine PrP humaine est localisé sur le chromosome 20 ; la durée de l'incubation est de 10 à 35 ans.

Les maladies provoquées par les prions touchent tous les Mammifères, et consistent dans des dégénérescences nerveuses, toutes mortelles. Elles sont connues depuis longtemps, la première d'entre elles, la tremblante du mouton, ayant été identifiée dès le XVIII[e] siècle. Cette maladie se manifeste par des modifications graves du comportement des animaux, en particulier une perte de coordination des mouvements. Au plan anatomique, elle se traduit par un aspect spongieux du système nerveux central (d'où le nom d'**encéphalopathie spongiforme**), accompagné parfois d'une prolifération anormale de certaines cellules nerveuses. Chez l'Homme, plusieurs syndromes équivalents sont décrits, dont le plus connu est la maladie de Creutzfeldt-Jakob qui est une forme de démence atteignant les sujets âgés. Bien que la plupart des cas soient sporadiques et très rares (fréquence de 10^{-6}), certaines formes de ces maladies (5 à 10 % des cas) sont héréditaires, comme l'«insomnie fatale familiale», décrite en 1992. La transmission de ces maladies rares a reçu un début d'interprétation avec l'observation, dans les années 50, que le cannibalisme était responsable d'une maladie semblable, dite «kuru», qui sévissait dans une population de Nouvelle-Guinée pratiquant la consommation rituelle de cerveaux humains.

La tremblante du mouton est expérimentalement transmissible à des souris ou à des hamsters, par simple injection intracérébrale de broyats de cerveaux de moutons infectés. Le fractionnement poussé de ces broyats montre que l'agent infectieux est une protéine seule (prion : anagramme de *pro*téine *in*fectieuse). Cette molécule, isolée en 1982 par S. PRUSINER, a des caractéristiques remarquables car elle résiste à de nombreux agents physicochimiques connus pour dénaturer ou dégrader les protéines classiques (chaleur, UV, ultrasons, formol, protéases). L'origine de la maladie semble claire ; la protéine prion qui s'accumule dans les cerveaux atteints sous forme d'agrégats, est une variante anormale et insoluble (PrPrés) d'une glycoprotéine de la membrane plasmique, fabriquée normalement dans l'organisme sain (PrP ; MM = 34 kDa). Cette dernière est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique, dirigée vers la surface de la cellule, puis rapidement dégradée *in vivo*, après endocytose, par des protéases lysosomales. Les séquences primaires de ces deux molécules sont rigoureusement identiques et il s'agit en fait d'isoformes présentant des conformations tridimensionnelles différentes : la PrPrés est en effet riche en feuillets β la forme normale que ne possède pas. On pense donc que l'infection repose sur :

1) la modification de la conformation de la protéine normale au contact direct avec la forme modifiée ;
2) le caractère autocatalytique de cette opération, puisque toute nouvelle molécule normale qui apparaît est transformée et devient à son tour transformante (réaction en chaîne) ;
3) l'accumulation irréversible, dans les neurones, des molécules modifiées qui sont d'une très grande stabilité.

Les cas sporadiques de ces maladies sont attribués à de rares conversions spontanées de la protéine normale, ou à des mutations somatiques du gène de la protéine prion. Malgré l'accumulation de données convergentes sur ce sujet, l'hypothèse de la «protéine seule» reste encore l'objet de controverses, car plusieurs chercheurs n'excluent pas l'idée que d'autres facteurs (Virus ou facteurs cellulaires) seraient impliqués pour la rendre pathogène.

Perspective biomédicale

Les infections virales émergentes

Depuis une quarantaine d'années, plusieurs épidémies (et parfois pandémies) dramatiques d'origine virale ont frappé l'humanité. Ces infections à fort retentissement sanitaire et médiatique sont dues à des virus qui semblent surgir de nulle part. Le caractère spectaculaire de ces épidémies, qui n'affectent pas forcément de grandes populations, est lié à une mortalité rapide et très élevée (jusqu'à 90 %), ainsi qu'à une forte invasivité (contagiosité).

La notion d'infection émergente date du début des années 90 et concerne les épidémies virales ou bactériennes récemment apparues de façon soudaine, ou ne s'étant pas manifestées depuis longtemps. Leur propagation est rapide, en termes de sujets touchés et de répartition géographique. En ce qui concerne les virus, on peut citer les exemples des fièvres hémorragiques foudroyantes (dues aux virus de Marburg : 1967, de Lassa : 1969 et d'Ebola : 1976), du sida (1981), des encéphalites causées par le virus West Nile (1994), de l'hépatite C, et de certaines formes de grippe.

En raison du caractère imprévisible et sporadique de ces infections émergentes, il est très difficile de connaître l'origine des virus impliqués, en particulier d'identifier les réservoirs de particules virales et leurs vecteurs. En effet, de nombreux virus infectent d'autres mammifères que les humains : singes ou rongeurs, ainsi que des oiseaux. Chez ces animaux sauvages, les mutations permanentes des génomes viraux font apparaître des formes virales potentiellement capables d'infecter l'Homme. Cependant, il ne suffit pas que la « barrière d'espèce » soit franchie, encore faut-il que la contamination de l'Homme ait lieu à partir du réservoir.

L'exemple des virus de Marburg et d'Ebola (qui appartiennent à une nouvelle famille : les filovirus) illustre la façon dont ceci peut se faire. Dans le premier cas, en 1967, il a été montré que c'est le contact direct avec des singes sauvages importés d'Ouganda (destinés à une société pharmaceutique), qui a contaminé 32 personnes, dont 7 sont mortes en dix jours. De même, les divers épisodes Ebola recensés récemment en Afrique centrale ou en Asie, sont toujours corrélés avec la consommation de viande de singes contaminés. Si ces derniers constituent clairement des vecteurs pour l'Homme, le réservoir n'est pas encore identifié avec certitude. Il semblerait en fait que des chauves-souris, animaux connus pour héberger un grand nombre de virus, infecteraient les singes, organismes omnivores (et frugivores) via leurs déjections déposées sur des fruits. Les recherches sur les insectes dont se nourrissent les chauves-souris ayant donné des résultats négatifs, on suppose que ces dernières représentent le véritable réservoir de virions.

Bien que la grippe soit une maladie virale commune et récurrente, elle connaît régulièrement des épisodes pandémiques graves. On peut citer la grippe espagnole (1918-1919), qui fit entre 20 et 50 millions de morts, la grippe asiatique (1957), la grippe de Hong Kong (1968) et la grippe russe (1977). Ces épidémies sont le plus souvent dues à des formes virales émergentes, issues d'événements rares de recombinaisons de génomes viraux spécifiques d'espèces animales différentes (notion de « cassure antigénique » ; voir encadré biomédical).

On a craint, en 1997, de voir se développer une nouvelle pandémie de grippe, plus meurtrière encore que celle de 1918. Cet épisode, qui a débuté à Hong Kong, n'a pourtant fait que huit victimes ; il s'agit de la grippe d'origine aviaire. Le phénomène biologique responsable de ce début d'épidémie n'a rien à voir avec les recombinaisons génétiques citées plus haut. Il a été montré, dans ce cas, qu'une forme virale infectant les oiseaux est passée directement à l'Homme, ce qui est tout à fait nouveau. La transmission du virus entre humains s'étant avérée inopérante, l'épidémie a été rapidement stoppée, mais au prix de l'abattage préventif d'un million et demi de poulets. Si ce nouveau génome, très virulent pour l'Homme, avait en plus présenté une contagiosité élevée, il aurait pu être à l'origine d'une pandémie extrêmement grave (ce dont les autorités sanitaires étaient bien conscientes).

Résumé

Les viroïdes, les plasmides et les Virus sont des entités génétiques se reproduisant au sein des cellules vivantes, dont ils dépendent entièrement pour les mécanismes nécessaires à l'accomplissement de leur cycle. Parmi eux, seuls les Virus présentent une phase de « vie » autonome, au cours de laquelle leur matériel génétique est protégé par une coque protéique entourée, dans certains cas, d'une enveloppe membranaire.

Les viroïdes sont des agents pathogènes de plantes très particuliers formés d'une molécule d'ARN double-brin fermé ; ils ne codent pour aucune protéine et interfèrent sans doute avec les mécanismes intervenant dans la transcription ou la traduction des cellules-hôtes. Les plasmides sont constitués d'ADN double-brin circulaire et ils infectent de nombreuses Bactéries. Grâce aux enzymes qu'ils codent, ces mini-chromosomes confèrent aux cellules qui les hébergent des propriétés intéressantes : résistance à des antibiotiques, fabrication de toxines ou de peptides participant à la compétition interspécifique, aptitude à utiliser de nombreux métabolites.

Les Virus sont des éléments génétiques, en général pathogènes, dont les formes de dissémination sont nommées virions. Leur organisation et leur taille sont très diverses et permettent l'empaquetage d'un matériel génétique de complexité variable, allant de quelques unités à plusieurs centaines de gènes. Trois types structuraux majeurs de virions sont reconnus : les virions hélicoïdaux, icosaédriques et les Bactériophages complexes. Chez les Virus d'Animaux, les deux premières catégories de nucléocapsides peuvent exister à l'état nu ou être recouvertes d'une enveloppe phospholipidique dérivée de la membrane plasmique de l'hôte.

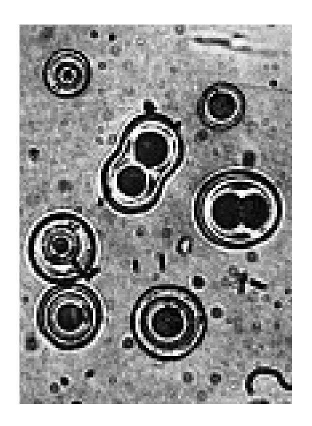
En fonction de la nature chimique de leur matériel génétique, les Virus ont développé des stratégies d'expression diverses et très originales par rapport aux processus cellulaires habituels. Les Virus à ADN ont un fonctionnement relativement simple, puisqu'ils utilisent directement les mécanismes et la machinerie cellulaire pour accomplir leur cycle. La multiplication des Virus à ARN nécessite des enzymes que ne possèdent pas leurs cellules-hôtes ; celles-ci sont codées par leur propre génome et doivent, dans certains cas (Virus à brin d'ARN négatif), être empaquetées dans le virion lui-même. Enfin, les Rétrovirus constituent une classe très particulière de Virus, car ils inversent le flux classique de l'expression de l'information génétique ; leur génome d'ARN est recopié en ADN, puis intégré dans le matériel génétique de la cellule-hôte. Ils sont le plus souvent cancérigènes.

Les prions sont des agents infectieux non conventionnels, pour lesquels aucun matériel génétique n'a pu être identifié. Il s'agit en fait de protéines qui acquièrent, pour diverses raisons, une stabilité les rendant indestructibles dans les conditions biologiques. Leur accumulation lente dans les tissus nerveux des Mammifères est responsable de dégénérescences mortelles. La transmission de ces particules franchit la barrière d'espèce.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Qu'appelle-t-on viroïdes, et quelle est la particularité remarquable de ces éléments génétiques ?
2. Quelles sont les caractéristiques majeures qui différencient les plasmides des viroïdes, d'une part, et des Virus, d'autre part ?
3. Quelles propriétés biologiques importantes les plasmides confèrent-ils aux Bactéries qui les hébergent ?
4. Grâce à quels mécanismes biochimiques les plasmides permettent-ils aux Bactéries de résister aux antibiotiques ?
5. Énoncer les caractéristiques permettant de définir les Virus et de les distinguer fondamentalement des êtres vivants.
6. Décrire les différents types d'organisation structurale que l'on rencontre chez les Virus, et citer au moins un représentant de chaque catégorie.
7. Décrire l'organisation précise d'un virion de bactériophage de type T4.
8. Décrire les principales phases communes à tous les cycles viraux.
9. Énumérer les différents types de cycles viraux rencontrés chez les Virus infectant les Animaux.
10. Quelle est la composition chimique de l'enveloppe d'un Virus dit enveloppé, et quelle est son origine au cours de la biogenèse du virion ?
11. Comment le Bactériophage T4 reconnaît-il précisément sa cellule-hôte, et comment l'infecte-t-il ?
12. Qu'appelle-t-on phase d'éclipse, et que se passe-t-il au cours de cette période en ce qui concerne l'expression du matériel génétique des Virus ?
13. En quoi un phage tempéré est-il différent d'un phage virulent ?
14. Comment le Virus de la grippe utilise-t-il son matériel génétique pour accomplir son cycle dans une cellule sensible ?
15. Comparer la mise en place et la libération des virions dans le cas du Bactériophage T4 et celui du Virus de la grippe.
16. Qu'est-ce qu'un Rétrovirus, et quelles sont les particularités remarquables du cycle de ces Virus ?
17. Pour quelles raisons le VIH est-il différent des autres Rétrovirus, et quel est son mode d'action dans l'organisme humain ?
18. De quelle manière les protéines de la capside et de l'enveloppe sont-elles fabriquées lors du cycle du Virus de la forêt de Semliki ?
19. Pourquoi les plasmides représentent-ils des outils de base en génie génétique ?
20. En quoi les prions sont-ils des entités autoreproductibles originales, et comment se transmettent-ils ?



Chapitre 16

L'ORIGINE DE LA VIE. L'APPARITION DES DIFFÉRENTS TYPES CELLULAIRES

La diversité des cellules actuelles, que nous avons analysée dans les chapitres précédents, et celle des organismes, que nous enseignent la microbiologie, la botanique et la zoologie, est le résultat d'une évolution de plus de trois milliards d'années. Dès les premières lignes de cet ouvrage, nous nous sommes interrogés sur les notions de vie et d'être vivant et avons énoncé les caractéristiques principales permettant de définir ces termes. Nous allons, dans ce chapitre de conclusion, apporter quelques précisions relatives à la question des origines qui avait alors été simplement posée.

Pour répondre aux multiples questions que soulève l'apparition de la vie et des cellules, deux démarches sont adoptées par les chercheurs. La première, qui part des origines, est expérimentale et cherche à reconstituer les étapes initiales de l'apparition des systèmes vivants, en simulant les conditions rencontrées sur la Terre primitive ; cette **démarche** est dite **constructiviste**. La seconde, qui part du présent, est celle des « paléontologues moléculaires » ; elle analyse les structures génétiques communes à tous les êtres vivants actuels et reconstitue leur histoire évolutive, à partir de « **fossiles moléculaires** » conservés dans les génomes. Il s'agit ici, avec les outils des évolutionnistes, de remonter le temps aussi loin que possible, pour comprendre le fonctionnement des ancêtres des cellules modernes. Ces deux approches peuvent-elles se rejoindre, et mieux encore se recouvrir ?

Il faut reconnaître qu'à l'heure actuelle subsiste encore une vaste *terra incognita* entre les domaines qu'elles étudient. Si l'on dispose en effet de nombreuses données fiables sur l'apparition de la matière organique sur la Terre primitive, d'une part, et sur l'évolution récente des cellules (en particulier l'origine des cellules eucaryotiques) et des êtres vivants en général, d'autre part, la transition entre le non-vivant et le vivant reste essentiellement l'objet de spéculations plus ou moins fondées.

1. HISTOIRE DE LA VIE SUR LA TERRE

1.1. Données de la géologie

Notre planète s'est formée par accrétion de poussières interstellaires, en même temps que le reste du système solaire, il y a 4,6 milliards d'années. Pendant une période qui a duré sans doute 500 millions d'années, la Terre a commencé par se refroidir, à dégazer son noyau en fusion (constituant ainsi son atmosphère primitive), et à mettre en place ses premiers continents et océans. Durant tout ce temps, elle a connu un volcanisme important et un bombardement très intense par une multitude d'astéroïdes de grande taille qui sillonnaient encore l'espace. Les roches sédimentaires les plus anciennes (trouvées au Groenland) sont âgées de 3,8 milliards d'années. Diverses données fournies par les géologues permettent de dater, avec une bonne précision, l'origine de la vie sur la Terre.

La plus ancienne matière organique connue, qui contient des hydrocarbures, des porphyrines, des purines, etc., s'est déposée dans des roches sédi-

mentaires, il y a environ 3,3 milliards d'années. L'origine biologique de cette matière est attestée par l'étude du rapport isotopique du carbone qu'elle contient et confirmée par l'observation, dans ces sédiments, de structures morphologiquement apparentées à des Procaryotes actuels. Il s'agit donc des plus anciens microfossiles connus, et cette observation démontre que la vie est apparue à une date antérieure, estimée à – 3,6 milliards d'années. Si l'on considère que la période initiale de formation de la Terre était incompatible avec l'émergence de la vie en raison de la température élevée de sa surface, on conclut que les processus qui ont conduit à l'apparition des premières cellules se sont échelonnés sur moins de 500 millions d'années. La durée de cette **période** dite **prébiotique** semble étonnamment courte, comparée à l'échelle des temps géologiques, et conduit à penser que la vie est bien un phénomène inéluctable qui se manifeste dès que des conditions appropriées sont remplies.

1.2. Données de la paléontologie

On connaît d'abondantes structures de type biologique dans des constructions organominérales fossiles d'aspect feuilleté, en forme de colonnes, appelées **stromatolithes**, dont les plus anciens sont datés de – 3,5 à – 3 milliards d'années. Sur des coupes fines, on y observe des micro-organismes morphologiquement identifiables à des Bactéries modernes, parmi lesquelles des Cyanobactéries typiques. Ces strates constituent des associations d'organismes photosynthétiques autotrophes associés à d'autres, sans doute hétérotrophes et dépendants des premiers. Cette analyse s'appuie sur le fait que des stromatolithes se forment, encore à notre époque, dans certaines zones côtières chaudes d'Australie, et présentent exactement les mêmes caractéristiques de taille, d'organisation interne et de microflore que celles des fossiles. Les Cyanobactéries, qui sont des Procaryotes complexes (voir chapitre 2), étaient donc représentées dès les débuts du monde vivant. Nous verrons plus loin comment la prolifération de ces organismes photosynthétiques a modifié l'atmosphère terrestre et a contribué à bouleverser l'écologie de la planète, entre – 2 et – 1 milliard d'années.

Une nouvelle catégorie de microfossiles apparaît brusquement, il y a environ 1,4 milliard d'années. Ces organismes unicellulaires, 10 à 100 fois plus grands que les précédents, possèdent des traits d'organisation interne suggérant qu'il s'agit des plus anciennes cellules eucaryotiques identifiées (**Acritarches**). On les observe dans des sédiments variés, et ils présentent un maximum de diversification de leurs formes vers – 800 millions d'années (phénomène de radiation évolutive). L'étape suivante dans l'histoire de la vie est l'apparition des premiers organismes pluricellulaires à caractère animal, dont on retrouve les traces dans des roches âgées de 670 millions d'années (**faune d'Ediacara**). On reconnaît déjà à cette époque des formes à corps mou rappelant des Invertébrés actuels : Méduses, Vers et Arthropodes nus. C'est vers – 550 millions d'années (Cambrien) que se développe une faune abondante et diversifiée d'Animaux à coquilles ou carapaces, dont les restes fossiles sont alors bien préservés (**faune de Burgess**). Il est remarquable de constater que l'acquisition de la pluricellularité et du cœlome est un processus qui a demandé moins de 100 millions d'années pour se réaliser.

Cette brève chronologie montre que la vie s'est tout d'abord manifestée sous la forme d'êtres de type procaryotique pendant 2 milliards d'années, avant que les Eucaryotes unicellulaires n'apparaissent. Les possibilités d'évolution des Procaryotes pendant cette longue période sont donc considérables et le fossé qui les sépare des Eucaryotes actuels est énorme, d'où les difficultés qui en découlent pour reconstituer l'histoire initiale du monde vivant. Il faut ajouter que l'on ne retrouvera pas forcément de traces fossiles de tous les micro-organismes de cette époque, en particulier ceux dépourvus de paroi, qui ont sans doute joué un rôle important dans l'évolution des cellules, comme on le verra plus loin.

2. PÉRIODE PRÉBIOTIQUE

Tout scénario décrivant l'origine de la vie doit inclure une étape initiale au cours de laquelle se sont élaborées, à partir du seul milieu minéral, les molécules biologiques élémentaires, c'est-à-dire les « briques » constituant les macromolécules (voir chapitre 1). Une question centrale à ce sujet est de savoir dans quelle mesure ces molécules ont une origine terrestre ou extraterrestre. Par la suite, se sont organisées des structures simples présentant certaines des caractéristiques de la vie, sans qu'on puisse toutefois les considérer comme des cellules modernes.

2.1. Origine des biomolécules primordiales

2.1.1. Origine terrestre

La première question qui se pose concernant l'apparition de la vie sur la Terre est celle du contexte, c'est-à-dire de la nature de son atmosphère primitive. L'étude des autres planètes et diverses considérations géochimiques conduisent actuellement à penser que celle-ci devait être riche en H_2, N_2, CO, CO_2 et H_2O. Le premier de ces gaz, très léger, s'est progressivement échappé du champ de gravitation terrestre, ne laissant plus que des gaz neutres ou oxydés. Si la nature exacte de cette atmosphère reste inconnue, il est certain qu'elle ne contenait pas d'O_2, car il n'existe pas de mécanisme susceptible de faire apparaître ce gaz sur la Terre primitive ; de plus, les sédiments les plus anciens (– 3,8 à – 2 milliards d'années) contiennent du fer sous la forme fer ferreux, qui n'a pu se déposer que dans une atmosphère réductrice ou neutre. Il faut enfin signaler que l'on a longtemps imaginé que cette atmosphère était riche en gaz tels que NH_3 ou CH_4, et donc hautement réductrice ; ce point sera discuté lors de l'étude expérimentale de l'origine des molécules prébiotiques.

Les gaz présents sur la Terre primitive sont relativement inertes et ne peuvent être à l'origine de molécules organiques que lorsqu'ils sont excités par d'intenses sources d'énergie permettant leur interaction chimique. Parmi celles disponibles alors sur la Terre, les plus efficaces étaient représentées par les radiations lumineuses (en particulier les UV qui n'étaient pas arrêtés par une atmosphère alors dépourvue d'ozone), et par les décharges électriques issues des orages, supposés nombreux à cette époque. À la suite des travaux et de la réflexion des pionniers des études sur l'origine de la vie (A. Oparin et J.B. Haldane, dans les années 20 et 30), les biochimistes étaient convaincus que l'on pouvait fabriquer les molécules élémentaires de la vie dans des conditions abiotiques. Il revient à S. Miller d'avoir conduit, en 1953, la première expérience démontrant qu'il était possible de faire apparaître une grande diversité de molécules organiques à partir d'un mélange gazeux et d'une source d'énergie censés exister sur la Terre primitive. L'encart suivant décrit cette expérience fameuse.

De nombreuses expériences de ce genre, dans lesquelles on fait varier la nature des mélanges gazeux et des sources d'énergie, sont encore conduites ; elles démontrent que l'on peut synthétiser, selon les conditions expérimentales, la plupart des biomolécules élémentaires connues. Cependant, des problèmes chimiques graves subsistent :

1) les réactions décrites sont souvent incompatibles les unes avec les autres ;
2) quelques acides aminés (Arg., Lys., His.) n'ont jamais pu être obtenus ;
3) certains composés (parmi les sucres) ne sont stables que s'ils sont liés à d'autres molécules.

Encart historique

L'expérience de S. Miller sur l'origine abiotique des biomolécules

Après avoir enfermé dans une enceinte close (dont le montage est donné dans la *figure* 16.1) un mélange gazeux composé de CH_4, NH_3, H_2 et H_2O, censé représenter l'atmosphère terrestre primitive, cet auteur soumet ce mélange à des décharges électriques continues pendant plusieurs jours. Des échantillons prélevés dans la phase aqueuse du montage montrent alors que 15 % du carbone initial sont passés sous forme organique dissoute et que les molécules obtenues sont constituées d'acides organiques et d'acides α aminés. Parmi ceux-ci, on identifie de nombreux composés typiques des cellules actuelles : glycine, alanine, valine, acide aspartique, leucine, acide acétique, acide lactique, acide succinique, formaldéhyde, etc. Ce résultat est surprenant car on obtient, avec un rendement important, un nombre limité de composés qui sont pour la plupart de type biologique.

Parmi les composés non biologiques abondants, on note la présence d'une grande quantité d'acide cyanhydrique (HCN) et de molécules voisines qui sont à la base, avec le formaldéhyde (HCHO), de chaînes de réactions formant des acides aminés simples, des sucres et des bases puriques (adénine). La chimie de cette famille de composés formés de H, C et N, riches en triples liaisons et très réactifs, est maintenant bien connue. Malgré son intérêt historique indéniable, la portée de cette expérience est actuellement remise en question car il est acquis que l'atmosphère primitive était beaucoup moins riche en gaz réducteurs (CH_4 et NH_3) que le mélange utilisé par Miller. Or, dans des conditions moyennement ou peu réductrices, les biomolécules qui apparaissent sont beaucoup moins abondantes et moins diversifiées.

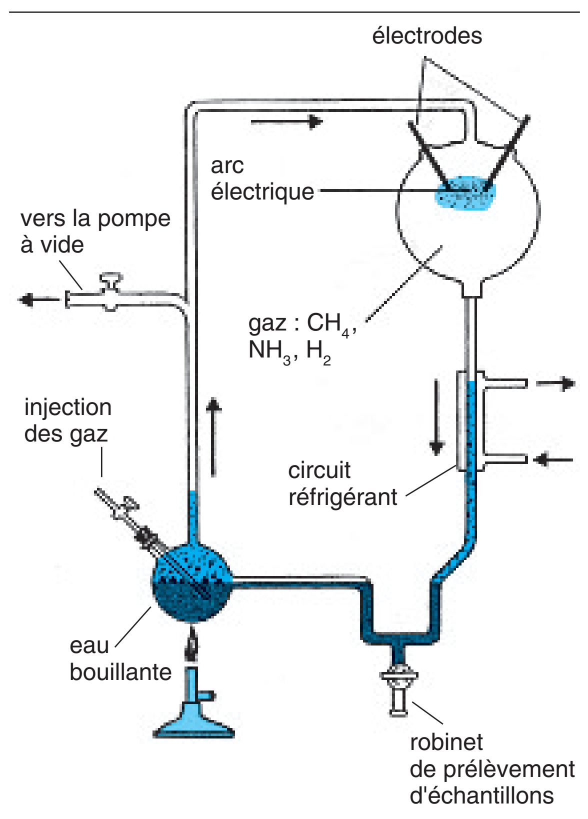


Figure 16.1

Dispositif expérimental utilisé par S. Miller pour réaliser des synthèses prébiotiques

Il s'agit d'une enceinte à circulation continue, contenant de l'eau à 80 °C (simulant l'océan primitif) et un système de condensation des vapeurs (simulant les pluies) ; le mélange gazeux réducteur contenu dans le dispositif est censé représenter l'atmosphère terrestre primitive. Un arc électrique constitue la source d'énergie permettant d'activer les molécules des gaz.

La dernière question est de savoir quelle quantité de matière organique dissoute a pu s'accumuler par cette voie sur la Terre primitive ; les avis divergent beaucoup à ce sujet, allant d'une solution très diluée jusqu'à des concentrations considérables. La notion de **soupe primitive**, proposée par Oparine, et définie comme un riche mélange de molécules organiques au sein duquel serait apparue la vie, est tombée en désuétude.

2.1.2. Origine extraterrestre

Une seconde source de composés organiques abiotiques est fournie par la chimie interstellaire. Il se forme actuellement, de façon spontanée au sein des nébuleuses, une grande quantité de molécules parfois complexes. Les développements de la radio-astronomie ont permis de détecter plus de 50 espèces moléculaires contenant, parfois réunis, les atomes de C, H, O, et N, typiques de la matière vivante. Parmi celles-ci, on trouve : l'acide cyanhydrique, la formamide, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'alcool méthylique, dont on a vu l'importance comme précurseurs dans la chimie prébiotique. De même, l'analyse des comètes (dont la célèbre comète de Halley, étudiée par cinq sondes spatiales en 1986), montre qu'elles sont elles-mêmes riches en matière organique et qu'elles constituent des réacteurs chimiques très efficaces.

La Terre est en permanence bombardée par des objets de taille variée, provenant de l'espace interplanétaire ou interstellaire. Parmi les plus gros objets atteignant le sol, on connaît depuis longtemps une catégorie de météorites d'un type particulier, nommées météorites carbonées ou **chondrites**. Elles contiennent une proportion importante de matière organique (jusqu'à 4 % de C) ; les molécules identifiées sont des hydrocarbures non biologiques, mais aussi des acides aminés L et D, des acides organiques classiques et des bases azotées. De façon étonnante, ces molécules sont identiques à celles obtenues dans les expériences de Miller. On sait aussi, depuis quelques années, que la Terre reçoit continuellement des micrométéorites (50-100 µm de diamètre) riches en matière organique, que l'on peut collecter en abondance dans les glaces de l'Antarctique (où les sources de contamination organique sont réduites) ; il tomberait ainsi 100 tonnes de cette matière extraterrestre par jour sur notre planète ! Certains auteurs estiment à environ 10^5 milliards de tonnes la masse totale de carbone apportée par cette voie pendant les 300 millions d'années où la Terre primitive a été abondamment bombardée (peut-être 1 000 fois plus intensément qu'à l'heure actuelle).

Une hypothèse, très en vogue actuellement, est celle de l'ensemencement de la Terre par des molécules organiques très diverses d'origine exogène, dont la quantité aurait largement suffi pour alimenter la chimie prébiotique terrestre. Quel que soit le scénario, l'ensemble de ces données confirme que des molécules simples et stables sont le résultat d'une évolution chimique qui peut se dérouler en tout endroit de l'Univers, dès que des conditions appropriées sont réunies. Il existe donc des mécanismes universels, qui ne sont pas forcément ceux mis en œuvre dans les laboratoires, mais qui ont pu présider à la réalisation des synthèses abiotiques sur la Terre primitive.

2.2. Origine des polymères biologiques primordiaux

L'étape importante suivante dans la chimie prébiotique est la formation, à partir des biomolécules élémentaires, des polymères biologiques, en particulier les protéines et les acides nucléiques. En effet, aucune des fonctions fondamentales caractéristiques des macromolécules actuelles : catalytiques, structurales et informatives, n'est présente dans les monomères seuls. La réaction de base utilisée chez les êtres vivants est une condensation (déshydratation) qui, paradoxalement, se réalise en phase aqueuse, condition favorisant normalement la réaction inverse. La **polymérisation abiotique** des macromolécules implique donc que la concentration des monomères a dû être localement très élevée ; l'évaporation (grâce à la chaleur du soleil), ou bien la congélation (qui isole l'eau sous forme de glace), sont deux moyens simples pour concentrer des solutions organiques. Les théories les plus récentes privilégient l'idée selon laquelle l'adsorption de composés organiques chargés à la surface de substances minérales a pu jouer un rôle crucial dans l'extraction et la concentration de quantités importantes de matière organique soluble. Les meilleurs candidats minéraux pour cette fonction catalytique sont constitués par les argiles (montmorillonnite), l'apatite (phosphate de calcium) ou la pyrite (sulfure de fer).

2.2.1. Synthèse des polypeptides

La polymérisation abiotique des acides aminés a été obtenue par diverses voies. La méthode la plus simple consiste à chauffer des mélanges secs d'acides aminés à 150-200 °C ; on obtient des **protéinoïdes**, qui ont des propriétés physicochimiques voisines de celles des protéines, et sont dotés d'activités catalytiques simples, essentiellement hydrolytiques. Si l'on utilise comme précurseurs des acides aminés adénylés (associés à de l'AMP), la polymérisation spontanée est très efficace à une température peu élevée, et des chaînes de 50 résidus sont aisément obtenues. Enfin, plusieurs composés instables et très réactifs, dérivés de HCN et trouvés parmi les molécules primordiales, s'avèrent être des **agents de condensation** capables de réaliser des liaisons peptidiques en phase aqueuse.

Il faut ici soulever la question relative à la chiralité (asymétrie stéréochimique) des acides aminés constituant les protéines ; on rappelle en effet que ces dernières sont actuellement formées d'acides aminés appartenant tous à la série L. Or, les synthèses non biologiques conduisent toujours à des mélanges équimolaires des formes L et D ; comment le choix de l'une d'elles s'est-il fait, sous quelles contraintes ? On sait seulement que des structures secondaires stables (hélice α et feuillet β) ne sont obtenues que si les segments de polypeptides sont homogènes sur une longueur supérieure à 6 acides aminés.

2.2.2. Synthèse des polynucléotides

De la même façon, plusieurs méthodes permettent d'obtenir des ribonucléotides à partir de bases azotées, à condition de disposer de ribose, et en présence d'agents de condensation appropriés. La fabrication abiotique des bases puriques et pyrimydiques est aisée. L'adénine, par exemple, est synthétisée simplement par l'action de HCN sur NH_3 dans l'eau ; on peut d'ailleurs la considérer comme un polymère formé de cinq molécules de HCN. La polymérisation des chaînes nucléotidiques à partir de ces précurseurs est également possible, à 60 °C, en présence de polyphosphates et de certains cations minéraux ; lorsque les nucléotides sont activés par un dérivé de HCN, cette réaction est encore plus aisée.

2.2.3. Synthèse des acides gras

La genèse des membranes biologiques actuelles implique des lipides de formule adéquate (voir chapitre 5). Les expériences de simulation montrent qu'il est très difficile d'obtenir des chaînes linéaires d'acides gras assez longues (> 12 C) pour former des bicouches stables. Les conditions efficaces conduisent à des chaînes branchées, ou bien sont irréalistes du point de vue des conditions physicochimiques exigées. On peut imaginer cependant construire des membranes, sur le principe de la bicouche, avec d'autres molécules que celles existant actuellement.

2.2.4. Limites de la démarche constructiviste

Toutes ces expériences indiquent que les conditions physicochimiques censées régner sur la Terre primitive sont compatibles avec une synthèse abiotique de biopolymères représentant assez fidè-

lement les deux principales classes de macromolécules qui fondent les phénomènes vitaux actuels : les protéines et les acides nucléiques. Ces expériences ne prouvent cependant pas que les voies découvertes sont uniques, et les résultats définitifs. De nombreuses inconnues subsistent en outre quant à l'origine de certaines molécules élémentaires, comme les acides aminés basiques et surtout le ribose. Il faut souligner enfin que les expériences de laboratoire sont optimisées, car conduites avec des composés purifiés, en concentrations élevées, et en l'absence de la multitude de molécules voisines coexistant sur la Terre dans les solutions organiques d'origine abiotique, qui devaient empoisonner les réactions « utiles ».

2.3. Origine des premiers systèmes autoréplicatifs : les protocellules

À ce niveau de l'exposé, on aborde la boîte noire de l'histoire de la vie, un domaine où la part de la spéculation l'emporte sur l'expérimentation. Il faut en effet imaginer, à un moment donné, l'émergence d'un système possédant les caractéristiques élémentaires du vivant, et qui assure le passage d'une évolution chimique prébiotique à une évolution de type biologique. Ce système protocellulaire, parfois nommé **cellule primordiale** ou **progénote**, encore très éloigné de la cellule classique, devait posséder les caractéristiques suivantes :

1) avoir une durée de « vie » – au sens chimique – significative ;
2) être capable de s'entretenir et de se reproduire (c'est-à-dire avoir acquis une mémoire) ;
3) être capable d'évoluer vers une structure encore plus performante (voir chapitre 1).

Il existe une controverse pour savoir quel type de macromolécule codée, c'est-à-dire potentiellement porteuse d'un message et faisant office de mémoire, est apparu le premier sur la Terre ; actuellement, celle-ci est toujours constituée par un acide nucléique. Plusieurs auteurs considèrent que les protéines ont pu initialement, à elles seules, remplir toutes les fonctions citées plus haut, et que les cellules primordiales auraient fonctionné sans information génétique, au sens moderne. D'autres pensent, au contraire, que les acides nucléiques sont apparus les premiers, et qu'une certaine forme de vie a pu exister sans les protéines qui seraient arrivées ultérieurement.

2.3.1. Le monde des protéines

Parmi tous les travaux effectués sur ce sujet, il faut citer les expériences historiques de deux chercheurs, A. Oparine et S. Fox, qui ont tenté de reproduire en laboratoire des structures ressemblant à des cellules primitives et mimant certaines de leurs activités.

Les travaux de Oparine, dans les années 30, sont à l'origine de la notion de **coacervat**. Dans certaines conditions expérimentales, des polymères organiques actuels forment des gouttelettes denses qui se séparent spontanément de la phase aqueuse environnante. Ces structures, qui semblent limitées par une pseudomembrane, peuvent contenir, à la manière des liposomes (voir chapitre 5), des enzymes que l'on introduit dans le milieu où elles se forment. Cet auteur a ainsi obtenu des pseudocellules effectuant des réactions enzymatiques simples, telles que des synthèses ou des dégradations (amidon), et des réactions d'oxydoréduction mettant en jeu du NADH ou de la chlorophylle. Ces coacervats ne sont pas capables de croissance continue, de reproduction ou d'évolution.

Dans la même lignée, les travaux de S. Fox sont beaucoup plus récents. Ils consistent dans la fabrication de globules voisins de ceux de Oparine, mais uniquement à partir de molécules simples et de protéinoïdes d'origine abiotique. Ces **microsphères**, dont le diamètre est de quelques micromètres, sont limitées par une structure de type membranaire et miment certains comportements des cellules : elles bourgeonnent, se divisent et fusionnent lorsqu'on change les conditions physicochimiques du milieu. Leur activité chimique est plus sophistiquée que celles des coacervats car elles peuvent, si on leur fournit des acides aminés ou des nucléotides activés d'origine abiotique, fabriquer des peptides ou des chaînes courtes de nucléotides. Cet auteur considère donc avoir jeté un pont entre les mondes prébiotique et biologique, et prétend que le flux de l'information génétique a pu fonctionner des protéines vers les acides nucléiques. La critique majeure faite à cette approche est qu'elle ne fournit aucune clé permettant de comprendre l'installation d'une boucle stable entre des molécules catalytiques et des molécules-mémoire. Il est clair, avec les connaissances actuelles en biologie moléculaire, que c'est du côté des acides nucléiques qu'il faut chercher des pistes pour imaginer un système à la fois autoreproductif et informatif.

2.3.2. Le monde de l'ARN

Depuis une trentaine d'années se renforce une hypothèse selon laquelle l'ARN aurait, d'une part, précédé l'ADN comme molécule mémoire quasi universelle au cours de l'histoire du vivant (on rappelle que seuls quelques Virus ont un génome d'ARN), et d'autre part, aurait pu jouer un rôle catalytique au même titre que les enzymes actuelles. Les défenseurs de cette hypothèse considèrent même qu'un type de vie, exclusivement basé sur l'ARN, a existé aux pemières époques de la Terre ; il aurait progressivement été remplacé par celui connu à l'heure actuelle, dans lequel les protéines jouent un rôle majeur ; c'est le **monde de l'ARN**.

Outre le fait que le ribose s'obtient plus facilement que le désoxyribose dans les conditions abiotiques, on remarque chez les cellules actuelles : 1) que les précurseurs de l'ADN sont tous formés à partir des précurseurs de l'ARN et, 2) qu'il existe une enzyme capable de fabriquer de l'ADN à partir d'ARN : la **transcriptase inverse** (voir chapitre 14). De plus, si l'ARN a les mêmes possibilités que l'ADN pour former des hybrides et s'autoreproduire, il possède en outre la capacité à s'organiser en structures tridimensionnelles complexes, dont l'ARNt est l'exemple le plus anciennement connu (voir chapitre 4). Il peut donc, à la différence de l'ADN qui se présente sous la forme d'une baguette rigide, et à l'image des protéines, réaliser des surfaces spécifiques capables de reconnaître des ligands ; grâce aux groupements des bases nucléiques, il pourrait donc éventuellement catalyser des réactions chimiques.

Des expériences de chimie abiotique montrent qu'un brin monotone d'ARN (poly C, par exemple) mis en présence de nucléotides activés est capable de servir de matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire (poly G). Cette donnée, qui suggère que l'ARN a pu fonctionner comme molécule autoréplicative initiale, n'est pas complète car on ne sait pas fabriquer de la sorte tous les polymères possibles, en particulier le poly U et le poly C. Dans ces conditions, la reproduction indéfinie des brins complémentaires ne peut être assurée ; la synthèse de longs brins non monotones et informatifs est *a fortiori* exclue, ce qui pose donc un problème grave !

En ce qui concerne les propriétés catalytiques de l'ARN, il a été montré, en 1981, que cette espèce moléculaire possédait certaines capacités enzymatiques attribuées jusque là seulement aux protéines. Sans entrer dans les détails, il faut savoir que certains ARN (en particulier l'ARNr d'un Protiste nommé *Tetrahymena*) peuvent *in vitro*, en l'absence d'enzyme et d'énergie, s'auto-épisser, c'est-à-dire se couper et rabouter les morceaux formés après élimination d'un long fragment interne de la molécule (intron ; voir chapitre 4). Depuis lors, de nouvelles familles d'ARN catalytiques ont été découvertes chez les Virus, les Bactéries et d'autres Eucaryotes ; ces molécules très particulières sont nommées **ribozymes**. De telles observations suggèrent que les ARN ont pu jouer un rôle équivalent à celui des protéines au cours de l'histoire de la vie. Cette idée est renforcée par le fait que de nombreux coenzymes modernes, libres ou liés à des protéines (NAD^+, FAD, Co A), sont des nucléotides ; certains auteurs considèrent qu'ils représentent les restes « fossiles » d'enzymes primitives et imaginent que les étapes du métabolisme ont pu être catalysées par des ribozymes. Il faut cependant souligner que le nombre de réactions identifiées et celui de leurs cibles (en fait uniquement l'ARN) restent très limités à ce jour.

2.3.3. Une troisième voie ?

Compte tenu des difficultés rencontrées dans la synthèse abiotique de certains éléments des nucléotides modernes et dans la réplication des chaînes polynucléotidiques, les chercheurs supposent que des polymères réplicatifs plus simples ont précédé les acides nucléiques actuels. Ces derniers semblent trop « parfaits », et ils pourraient en fait résulter de l'évolution de molécules ayant les mêmes propriétés qu'eux, mais construites à partir de monomères plus abondants sur la Terre primitive. On peut imaginer, par exemple, des molécules ayant un squelette de glycérol-phosphate, plus facile à obtenir que le ribose-phosphate, et portant des bases différentes de celles actuelles, ou en nombre plus réduit. La seule chose vraiment importante, au fond, est qu'il existe une complémentarité structurale entre les monomères de deux brins opposés. Plusieurs familles de ces proto-acides nucléiques se sont peut-être succédées au cours du temps, s'éliminant les unes les autres, par sélection des plus performantes ; il pourrait ainsi ne subsister aucune trace de ces premiers mécanismes chez les organismes modernes. Il est à craindre que l'on veuille faire dire aux acides nucléiques modernes plus de choses que ce qu'ils peuvent dire !

3. DES PROTOCELLULES À LA CELLULE ANCESTRALE

Nous avons vu que toutes les cellules modernes présentent des mécanismes génétiques fondamentaux, des biomolécules et des voies métaboliques identiques. Il faut donc admettre qu'elles dérivent d'une cellule ancestrale commune qui possédait déjà toutes ces caractéristiques, et était d'une complexité voisine de celles actuelles ; elle résultait forcément elle-même d'une longue évolution. L'invention, par les cellules primordiales dérivées des « expériences » prébiotiques, de l'ADN comme matériel héréditaire, du code génétique, des ribosomes, du métabolisme intermédiaire et énergétique etc., est donc extrêmement ancienne. Il est d'ailleurs probable que plusieurs types de systèmes répondant à la définition large de système vivant ont existé, mais il est en tout cas sûr qu'une seule lignée a été sélectionnée par l'évolution pour donner l'ensemble des cellules actuelles.

Quel était l'aspect de la cellule ancestrale qui a éliminé toutes ses concurrentes ? On ne le saura peut-être jamais, mais on est certain que les Procaryotes actuels, qui sont le résultat d'une très longue évolution allant dans le sens de la simplification, n'ont plus rien à voir avec la cellule procaryotique ancestrale dont ils descendent. Le seul espoir est dans l'**exobiologie**, c'est-à-dire la recherche de la vie en dehors de la Terre ; il se peut que des traces fossiles de ces êtres existent sur Mars, où une forme de vie a pu apparaître, mais qui aurait été stoppée dans son évolution, car l'histoire géologique de cette planète est fondamentalement différente de la nôtre. Il n'est pas possible de décrire en détail les hypothèses plus ou moins fondées concernant l'acquisition, par le ou les progénotes, de toutes les nouveautés ayant permis de conduire à la première cellule vraie. Nous nous contenterons ici d'énumérer les caractéristiques principales qui différencient fondamentalement cette dernière de ses ancêtres pré-vivants.

3.1. Compartimentation et membranes

Les premiers systèmes autoréplicatifs ne ressemblaient pas aux cellules modernes, mais ils étaient très certainement limités par une membrane de nature inconnue. Ceci est une nécessité absolue car aucune réaction chimique ne peut se produire efficacement si les enzymes ou les précurseurs en jeu sont soumis à la libre diffusion. Les surfaces minérales ont un moment pu remplir cette fonction de concentration des réactants, mais il a bien fallu que la vie naissante s'en affranchisse et passe « en trois dimensions ». Dans un milieu homogène, on comprend mal aussi, par exemple, comment une relation privilégiée entre un ARN (ou toute molécule informationnelle équivalente) et une protéine primitive facilitant sa synthèse (dans un rapport de codage) aurait pu être maintenue sans une barrière physique. Les notions de compétition et de sélection, à la base de toute l'évolution biologique impliquent l'isolement précoce de boucles de rétroaction.

Des bicouches se sont sans doute organisées très tôt en vésicules de type liposome (voir chapitre 5) et ont enfermé des systèmes chimiquement ou génétiquement variés. Ces structures membranaires n'étaient pas forcément constituées de phospholipides, mais toute molécule ayant des propriétés amphiphiles équivalentes pouvait jouer ce rôle. On imagine ensuite des phénomènes de fusion entre des multitudes de vésicules différentes correspondant à des « expériences prébiotiques » uniques, permettant une mise en commun de ces systèmes. Les potentialités exploratoires d'une telle combinatoire sont considérables. Enfin, il ne faut pas oublier la question de la perméabilité de ces membranes vis-à-vis du milieu, qui a également dû être réglée de façon précoce.

3.2. Apparition des métabolismes

Tous les êtres vivants actuels sont dotés, pour assurer leur croissance, d'un métabolisme fournisseur de précurseurs chimiques et d'énergie. Si les premiers systèmes autoréplicatifs ont pu utiliser des molécules d'origine abiotique pendant quelque temps, il est clair que leur perpétuation a été liée à la mise en place de réactions catalysées (par des ARN ou des protéines), fournissant les métabolites épuisés sur la Terre. Une forte pression de sélection s'est exercée alors, qui a favorisé l'émergence de nouvelles voies de synthèse ou de dégradation. Les scénarios sur l'apparition des métabolismes restent très spéculatifs, et seule une séquence vraisemblable d'événements est proposée ici.

On admet que les premiers systèmes, nécessairement anaérobies, étaient basés sur les fermenta-

tions et l'hétérotrophie, et qu'ils ont rapidement été suivis par l'invention de la **photosynthèse non oxygénique**, utilisant H_2S comme donneur d'électrons. Ce métabolisme autotrophe simple n'utilise qu'un seul photosystème, voisin du PS I des Végétaux verts (voir chapitre 10) ; il est pratiqué de nos jours par les seules Bactéries photosynthétiques sulfureuses pourpres et vertes, anaérobies (voir chapitres 1 et 2), l'origine des dernières étant probablement très ancienne. Le PS II serait apparu plus tard et aurait complété le PS I chez les Cyanobactéries, qui réalisent la **photosynthèse oxygénique** utilisant H_2O comme réducteur primaire. Il semble en outre que les actuelles pompes à protons mues par l'ATP (et réversibles), dont la répartition est universelle parmi les Procaryotes, soient une invention très ancienne qui aurait initialement permis de neutraliser le pH des cellules primitives.

La conséquence majeure de l'invention de la photosynthèse oxygénique, qui donnait accès à une source inépuisable de donneur d'électrons, a été l'accumulation progressive d'O_2 gazeux dans l'atmosphère. Il a fallu plus d'un milliard d'années pour que sa teneur passe d'une valeur voisine de 1 % (vers – 2 milliards d'années), à la valeur actuelle (21 %), atteinte il y a 8 à 900 millions d'années. L'O_2 est donc un déchet du métabolisme des Cyanobactéries, et il a constitué un poison mortel pour tous les êtres vivants anaérobies contemporains. La « respiration » des nitrates et des sulfates, pratiquée aujourd'hui par quelques Bactéries en anaérobiose (voir chapitre 1), est sans doute un métabolisme précurseur de la **respiration** classique qui implique l'O_2 et qui est à la base de l'hétérotrophie de la plupart des organismes aérobies actuels. Nous décrirons plus loin l'événement extraordinaire qui a permis à ce métabolisme énergétiquement très performant de se développer sur la Terre. Il est enfin admis que les Cyanobactéries vivant il y a 2 milliards d'années étaient capables de fixer l'azote atmosphérique.

3.3. Machinerie de synthèse des protéines et code génétique ; origine des génomes d'ADN

Il s'agit d'abord de comprendre comment s'est mise en place une boucle d'une exceptionnelle efficacité, qui a permis la mise en mémoire, dans une molécule, d'activités catalytiques assurant la reproduction de cette même mémoire. Le système actuel, basé sur l'existence d'une correspondance entre structures linéaires, est d'une grande complexité et met en jeu des centaines de macromolécules (voir chapitre 4). Le problème de l'origine du codage génétique et de la machinerie qui est associée à son décryptage (ribosomes, ARNt, etc.), ainsi que celui de l'origine des génomes modernes, ne peut malheureusement être traité dans le cadre de cet ouvrage. L'expérimentation n'occupe guère de place dans tout ce domaine ; nous nous contenterons donc seulement de proposer quelques questions générales.

- Les mêmes molécules ont-elles été à la fois informatives et catalytiques ? Sinon, quel type d'interaction s'est établi à l'origine entre ces deux catégories de molécules ?
- Le code génétique universel, et donc « ancestral », est-il arbitraire, ou déterminé ? A-t-il été unique, ou bien est-il le dernier d'une série de tentatives avortées ?
- Existe-t-il des relations entre des codons et des acides aminés particuliers ?
- Le codage a-t-il toujours impliqué des triplets et y-a-t-il toujours eu vingt acides aminés dans les protéines ?
- À quoi ressemblaient les ribosomes et les ARNt primitifs ?
- Comment étaient organisés les premiers gènes d'ARN, quelle était leur taille et comment étaient-ils répliqués ?
- Comment le passage des génomes d'ARN à ceux d'ADN, molécule plus adaptée pour stocker une information de façon stable, s'est-il effectué ?

4. APPARITION DES CELLULES EUCARYOTIQUES ; ORIGINE DES ORGANITES

Le plan d'organisation eucaryotique, caractérisé par une compartimentation poussée, étant beaucoup plus complexe que le plan d'organisation procaryotique (voir chapitre 2), la question posée ici est celle du passage de l'un à l'autre au cours de l'évolution de la vie sur la Terre. La paléontologie situe l'origine probable des cellules eucaryotiques vers – 1,4 milliard d'années, moment où l'augmentation de la taille de certaines cellules fossiles est interprété comme le résultat d'un accroissement des systèmes membranaires internes et l'apparition

d'organites spécialisés. S'il est évident que les Procaryotes ont précédé les Eucaryotes sur notre planète, il faut bien se rendre compte que l'évolution qui a présidé au passage d'un plan à l'autre a duré au moins 2 milliards d'années, ce qui, en l'absence de fossiles, laisse une large place à la spéculation.

Lorsqu'on imagine l'ancêtre procaryotique des cellules eucaryotiques, la **cellule proto-eucaryotique** (parfois nommée **urcaryote**), il ne faut sans doute pas se le représenter comme les Bactéries actuelles, en arguant du fait que ces dernières ont une organisation simple. La simplicité d'une cellule ou d'un organisme modernes n'est absolument pas une preuve du caractère primitif (au sens de premier) de leur organisation, cette dernière pouvant résulter d'une simplification secondaire due à une spécialisation et un mode de vie particuliers. Nous verrons plus loin que ceci est vrai aussi bien pour les Procaryotes que pour les Eucaryotes. Deux théories sont avancées au sujet de l'origine des organites eucaryotiques, opposées en apparence mais en fait non exclusives et complémentaires, et dont l'une est actuellement avérée en ce qui concerne deux types d'organites : les mitochondries et les plastes.

4.1. Théorie endogène

Cette théorie explique l'origine de la compartimentation de la cellule eucaryotique en proposant des phénomènes multiples d'invagination de la membrane plasmique dans une cellule procaryotique géante dépourvue de paroi. Ce processus, avec quelques variantes, est à même de rendre compte de l'origine des organites à membrane simple ou double (voir *figure* 16.2). Il est ainsi

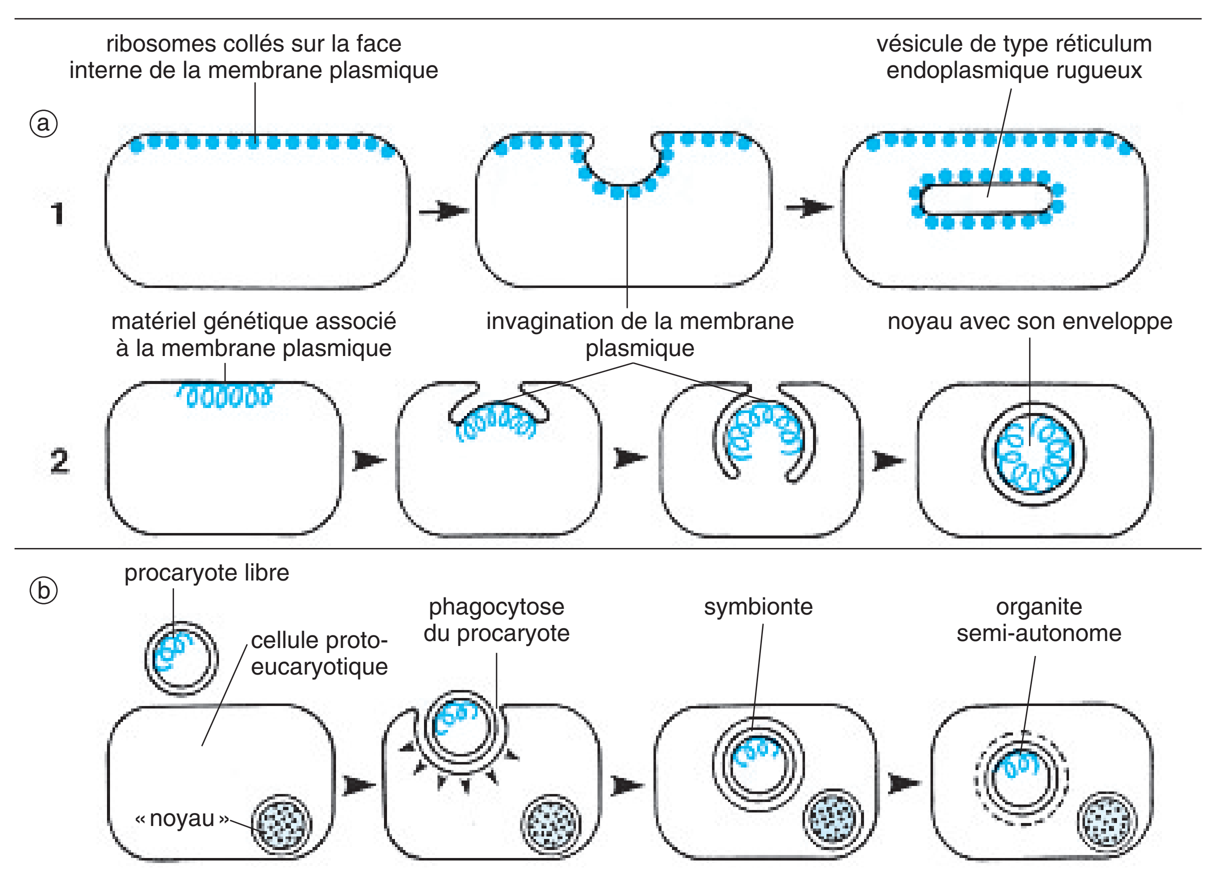


Figure 16.2

Représentation simplifiée des hypothèses rendant compte de la genèse des principaux organites eucaryotiques chez une cellule ancestrale procaryotique

(a) Origine endogène des systèmes membranaires internes par invagination de la membrane plasmique : **1)** réticulum endoplasmique ; **2)** noyau.
(b) Origine endosymbiotique des mitochondries et des plastes (endosymbiose primaire).

facile d'expliquer, par une simple vésiculisation de type endocytose, l'apparition du réticulum endoplasmique rugueux ; les ribosomes qui le recouvrent sont en effet équivalents, par leur position, à ceux observés sur la face interne de la membrane plasmique des cellules bactériennes actuelles. Au lieu d'être directement sécrétées dans le milieu extracellulaire, les protéines que ces ribosomes fabriquent sont alors transitoirement accumulées dans la lumière d'une vésicule, ce qui permet l'émergence de toutes les modifications post-traductionnelles décrites dans le chapitre 9.

Le fait que l'on trouve dans des systèmes endomembranaires eucaryotiques de nombreuses enzymes intervenant dans le métabolisme des lipides, par exemple, ou bien des transporteurs (de métabolites ou d'électrons) qui appartiennent typiquement à la membrane plasmique des Procaryotes actuels, renforce cette hypothèse. L'origine des lysosomes et de l'appareil de Golgi dans la cellule proto-eucaryotique pourrait aussi découler de cet événement initial. L'apparition du noyau et des organites semi-autonomes est interprétée, dans le cadre de cette hypothèse, comme le résultat d'une invagination de nature plus complexe, semblable à celle décrite dans la *figure* 16.2. Les mitochondries et les plastes se seraient secondairement différenciés autour d'un matériel génétique endogène de taille plus modeste que celui enfermé dans le noyau. La nature de la cellule primitive, au sein de laquelle ces événements auraient eu lieu, varie suivant les auteurs : selon certains, il s'agirait d'une grande Bactérie aérobie tandis que d'autres pensent qu'il pourrait s'agir d'une Cyanobactérie.

4.2. Théorie endosymbiotique

De très nombreuses données accréditent une autre théorie, basée sur la notion de symbiose, et qui renouvelle complètement notre façon de comprendre l'origine des cellules eucaryotiques. Il s'agit de la **théorie endosymbiotique** que l'on considère à l'heure actuelle comme démontrée pour les mitochondries et les chloroplastes. Selon celle-ci, ces organites dérivent de cellules procaryotiques qui auraient été capturées par phagocytose, puis asservies par une cellule-hôte ancestrale, elle-même bâtie sur le plan procaryotique, mais dont nous verrons qu'elle ne ressemblait sans doute pas à ses congénères. Nous proposerons aussi une hypothèse expliquant le succès évolutif de ce type d'association, puisque pratiquement tous les Eucaryotes sont pourvus de mitochondries. Sur la base d'arguments moins solides, certains auteurs pensent que cette hypothèse est également valide pour expliquer l'origine des peroxysomes et celle des cils ou des flagelles eucaryotiques.

Depuis presqu'un siècle, les biologistes ont été frappés par les ressemblances existant entre mitochondries et Bactéries, d'une part, et chloroplastes et Cyanobactéries, d'autre part. Ils ont donc très tôt soupçonné que ces organites eucaryotiques pouvaient dériver de Procaryotes, à l'issue d'un événement de type endosymbiotique. Cette hypothèse, fondée sur une simple parenté morphologique, fut abandonnée jusqu'au début des annés 60, où elle commença à être étayée par des arguments de plus en plus convaincants. À l'appui de cette idée, il y a aussi l'observation qu'il existe de nos jours de nombreuses associations de ce type entre Bactéries et cellules eucaryotiques : les «cyanelles» de certains Protistes (*Paulinella chromatophora*, *Cyanophora paradoxa*) ne sont rien d'autre que des Cyanobactéries vivant en symbiose ; divers Ciliés et Amibes (*Pelomyxa palustris*) contiennent des Bactéries symbiotiques ; les cellules de *Rhizobium* envahissent les cellules des racines des Légumineuses (voir chapitre 15) et celles de *Prochloron*, une Bactérie photosynthétique, colonisent les Ascidies.

4.2.1. Capture et «domestication» des ancêtres des mitochondries

Nous avons à plusieurs reprises signalé les ressemblances structurales, biochimiques et génétiques qui rapprochent les mitochondries des Eubactéries :

- existence d'une double membrane, comme chez les Bactéries Gram-négatives, et de constituants membranaires typiques : la porine, dans la membrane externe, et le diphosphatidyl-glycérol dans la membrane interne (voir chapitres 5 et 10) ;
- organisation similaire des systèmes énergétiques générateurs d'ATP : transporteurs membranaires d'électrons et ATP synthétases, fabrication d'un gradient de protons transmembranaire (voir chapitre 10) ;
- présence d'un matériel génétique, sous la forme d'une molécule d'ADN circulaire, dont l'organisation des gènes (ordre et séquences nucléotidiques) est en général semblable à celle des Eubactéries, bien qu'il existe des introns dans

certains gènes mitochondriaux d'Eucaryotes, en particulier chez les Champignons (voir chapitre 4) ;
– existence d'une machinerie de synthèse des protéines (ribosomes) voisine de celle des Bactéries et présentant la même sensibilité aux antibiotiques (voir chapitre 4).

Les phylogénies moléculaires, dont nous parlerons plus loin, basées en particulier sur l'analyse des séquences des gènes ribosomiques, prouvent que toutes les mitochondries ont une même origine et sont proches des Protéobactéries actuelles. C'est dans ce vaste groupe de Bactéries Gram-négatives, souvent aérobies, que l'on trouve les genres *Rhizobium* ou *Agrobacterium*, les Bactéries pourpres sulfureuses ou non, les Bactéries dénitrifiantes, etc. Il est clair qu'un seul événement d'endosymbiose mitochondriale est à l'origine des cellules Eucaryotiques actuelles (monophylétisme) ; dans quelles conditions celle-ci s'est-elle établie ? Nous avons déjà dit que l'O_2 produit par les Cyanobactéries avait constitué un poison violent pour tous les organismes anaérobies (photosynthétiques ou fermentaires) qui vivaient entre – 2 et – 1 milliard d'années, comme il l'est encore pour les anaérobies stricts actuels.

Beaucoup de lignées ont dû progressivement disparaître de la planète, sauf celles qui ont survécu dans des biotopes dépourvus d'O_2, et celles qui ont pu détoxifier ce poison ou l'utiliser de façon positive. C'est cette pression de sélection très forte qui est à l'origine du métabolisme aérobie et de la respiration cellulaire chez les Procaryotes de cette époque, en particulier les ancêtres des Protéobactéries. Il faut ajouter qu'une conséquence majeure de la présence d'O_2 dans l'atmosphère a été l'apparition de la couche d'ozone (O_3), qui protège la surface de la Terre des UV, ce qui a permis à la vie de coloniser les continents.

Les ancêtres des Eucaryotes, anaérobies eux aussi, et peut-être incapables d'évoluer dans ce sens, n'ont dû leur survie qu'à cet événement de phagocytose avortée et stabilisée d'une cellule aérobie ; celle-ci non seulement détoxifiait leur cytoplasme en consommant l'O_2 et en formant H_2O, mais elle leur apportait aussi une source d'énergie incomparablement plus grande que leur fermentation propre. On comprend bien l'avantage sélectif considérable représenté par une telle symbiose, et donc son sens évolutif. Dans le cadre de cette théorie, certains auteurs pensent que les peroxysomes dériveraient aussi d'ancêtres procaryotiques aérobies, qui auraient conduit à une première détoxification du cytoplasme de la cellule eucaryotique ancestrale, mais sans apport d'énergie. Cette symbiose, antérieure à celle des mitochondries, aurait permis à cette dernière de résister à des tensions croissantes d'O_2 ; elle se serait ensuite maintenue en raison d'activités métaboliques nouvelles liées aux peroxysomes, devenues peu à peu indispensables à la cellule-hôte.

Dans tous les cas, ces phénomènes d'endosymbiose étant des événements très anciens, de nombreuses modifications du symbionte allant dans le sens de sa simplification, ont eu lieu depuis lors. La principale conséquence a été la transformation progressive de la simple tolérance du symbionte en un asservissement, à la suite de transferts de gènes de ce dernier vers le noyau de l'hôte. Cette chose est assez facile à imaginer depuis les expériences de génie génétique et de transgenèse chez les Eucaryotes, qui montrent que de l'ADN étranger peut s'incorporer aisément dans les chromosomes de l'hôte. Parallèlement, la réduction importante du matériel génétique du symbionte a nécessité la mise en place de systèmes de transport de protéines, désormais fabriquées dans le hyaloplasme, vers les organites (séquences-signal, récepteurs, etc.), voir chapitre 9. L'absence d'ADN dans les peroxysomes serait un argument en faveur de l'ancienneté de cette endosymbiose primordiale.

4.2.2. Origine des chloroplastes

Toutes les observations faites pour les mitochondries sont aussi valables pour les chloroplastes. De façon encore plus claire que pour les premières, les données structurales, biochimiques et surtout moléculaires démontrent que les plastes de tous les organismes photosynthétiques eucaryotiques dérivent des Cyanobactéries (voir *figure* 16.3). L'événement endosymbiotique initial s'est produit après celui qui est à l'origine des mitochondries. Il a eu des conséquences considérables à l'échelle planétaire, car il confère à la cellule-hôte le caractère d'autotrophie totale, celle-ci pouvant désormais survivre à partir des seuls éléments minéraux du milieu. Le nouveau type cellulaire ainsi créé, réunissant les avantages liés au statut eucaryotique et ceux liés à l'autotrophie, a pu conquérir la Terre, coloniser tous les biotopes et devenir un producteur primaire très important.

Nous avons souligné, dans le chapitre 10, la diversité de structure et de composition en pigments des plastes rencontrés chez les Algues. On

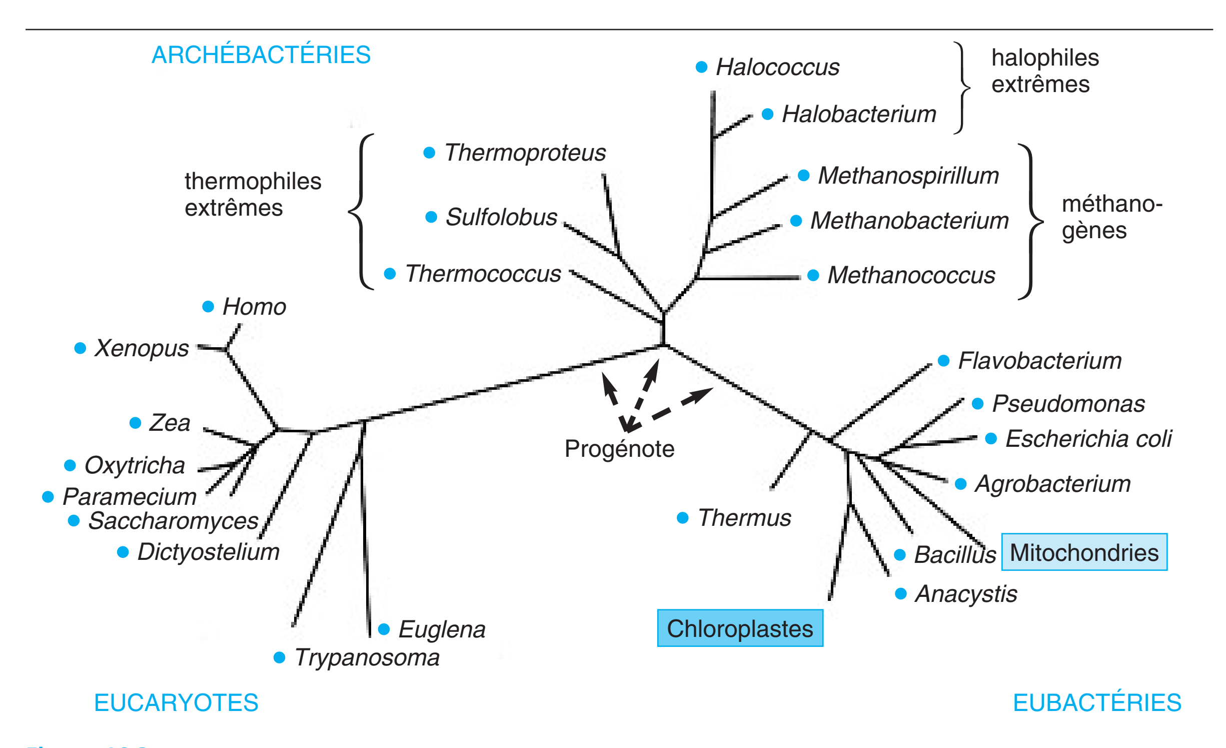


Figure 16.3

Arbre phylogénétique universel du vivant

Cette représentation simplifiée a été établie à partir de l'étude comparative des ARNr 16-18 S ; elle est confirmée par toutes les analyses portant sur des gènes de protéines les plus divers. Les séquences des mitochondries et des chloroplastes ont été indiquées pour montrer leur enracinement dans la lignée des Eubactéries (respectivement au niveau des Protéobactéries et des Cyanobactéries).

La façon exacte dont les trois empires, bien visibles, dérivent du progénote initial reste l'objet de discussion et la trifurcation simple de la figure ne traduit pas les relations précises qui existent entre eux ; la taille des branches est proportionnelle à la distance évolutive. Les Protistes sont représentés par les genres *Oxytricha*, *Paramecium*, *Trypanosoma* et *Euglena*.

distingue, parmi elles, quatre grands groupes : les Chlorophycées (Algues vertes), les Rhodophycées (Algues rouges), les Euglénophycées et les Chromophycées (Algues brunes et divers groupes mineurs associés). Les plastes des cellules des deux premiers groupes possèdent deux membranes, tandis que ceux des suivants ont trois ou quatre membranes. Devant de telles différences, la question s'est posée de savoir si les trois lignées de plastes correspondantes résultent d'un seul, ou de plusieurs événements d'endosymbiose ; on a depuis peu la preuve, grâce à l'analyse des arbres phylogénétiques moléculaires, qu'ils se sont produits à plusieurs reprises au cours de l'évolution.

Un premier événement d'endosymbiose a conduit à la capture et à l'annexion d'une Cyanobactérie par une cellule Eucaryotique déjà pourvue de mitochondries. Cette **endosymbiose primaire** est du même type que celle ayant produit ces dernières ; elle est à l'origine des premières Algues et se retrouve actuellement telle quelle chez les Chlorophycées et leurs descendants, constitués par tous les Végétaux verts (lignée des Chlorobiontes) d'une part, et chez les Rhodophycées, d'autre part. En revanche, ce sont des endosymbioses plus complexes, établies indépendamment les unes des autres entre un Eucaryote déjà photosynthétique, et un autre Eucaryote, qui sont à l'origine récente de trois groupes au moins d'Algues : les Cryptophycées, les Chromophycées et les Euglénophycées. Ce type d'événement remarquable porte le nom d'**endosymbiose secondaire**. Dans le premier de ces trois groupes, qui possède des plastes à quatre membranes, on retrouve encore un vestige du noyau de la cellule eucaryotique capturée, sous la forme de ce que l'on appelle le **nucléomorphe**. Les deux membranes qui contiennent ce dernier et entourent aussi l'enveloppe du plaste, sont censées représenter la membrane du phagosome (issue de l'hôte) et la membrane plasmique du symbionte.

4.3. Quel ancêtre pour les cellules eucaryotiques ?

L'ancêtre des cellules eucaryotiques ayant capturé les futures mitochondries devait, dans le cadre général du plan d'organisation procaryotique, présenter les caractéristiques originales suivantes :

– il ne devait pas posséder de paroi épaisse et rigide (empêchant la phagocytose), mais être limité par une membrane souple, comme les cellules animales actuelles. En ce sens, il se distingue de la plupart des Procaryotes actuels ;

– il était nécessairement de grande taille et en mesure d'absorber des cellules procaryotiques plus petites que lui en pratiquant la phagotrophie ;

– il devait être hétérotrophe et capable de se nourrir de molécules organiques ou de particules présentes dans le milieu. Au plan énergétique, il devait être fermentaire et réaliser la glycolyse ou tout métabolisme équivalent ;

– il disposait sans doute d'un réseau membranaire interne, équivalent au réticulum endoplasmique, pour compenser une faible surface membranaire relative (sauf si sa membrane était pourvue de nombreuses expansions), et peut-être de lysosomes lui permettant de digérer ses proies ;

– son cytoplasme était probablement renforcé par un système squelettique assurant en outre sa motilité (l'ancêtre du cytosquelette).

Une telle cellule ne ressemble pas du tout aux Bactéries actuelles, d'organisation beaucoup plus simple, auxquelles elle est pourtant directement apparentée ; elle possède déjà de nombreux traits « modernes » et son information génétique doit être importante. Il se peut que plusieurs lignées proto-eucaryotiques de ce type aient existé, mais une seule a survécu après l'événement endosymbiotique qui a donné les mitochondries. La question qui n'est pas réglée est celle du noyau, élément caractéristique des Eucaryotes modernes. La cellule ancestrale avait-elle déjà enfermé son matériel génétique au sein d'une enveloppe membranaire, avec les conséquences génétiques fondamentales que l'on sait, ou pas ? Avait-elle un ou plusieurs noyaux et comment se divisait-elle ? La mitose et la méiose existaient-elles ? Possédait-elle des flagelles (dont la structure est remarquablement homogène chez tous les Eucaryotes) ?

5. CONCLUSION : L'ARBRE UNIVERSEL DU MONDE VIVANT

5.1. Phylogénies moléculaires et évolution

Si l'on admet que l'apparition des cellules sur la Terre constitue un événement unique, tous les êtres vivants ont un même ancêtre et résultent d'une même histoire, vieille de plus de 3 milliards d'années. Ils présentent donc des liens de parenté et un arbre généalogique doit pouvoir être tracé ; on appelle **arbre du vivant** cette représentation qui montre les relations phylogénétiques existant entre toutes les lignées actuelles. Les premières tentatives de ce genre datent de plus d'un siècle (Haeckel, 1866), mais c'est seulement depuis une trentaine d'années que l'on dispose d'informations objectives et fiables, non entachées d'anthropomorphisme, de finalisme et de progrès. Il est en effet souvent difficile de distinguer un niveau de complexité (ou grade) dans une structure ou un organisme, d'un degré d'évolution : un être d'organisation simple n'est pas forcément primitif.

Il a donc fallu trouver un moyen objectif pour mesurer les distances évolutives existant entre les taxons. Les êtres vivants proches au plan systématique possèdent des protéines identiques ou très voisines (dites homologues) car ils partagent des gènes voisins dérivant d'un ancêtre commun, plus ou moins éloigné au cours de l'évolution. L'étude des séquences des molécules informationnelles : acides nucléiques et protéines, est un moyen de quantifier le degré de parenté entre organismes ; elles constituent une source d'information inégalée pour les évolutionnistes. Le premier arbre universel du vivant est dû à C. Woese (1977) ; il se fonde sur la comparaison des séquences nucléotidiques des ARN ribosomiques, qui sont des molécules universelles, et héritées, comme on l'a dit, d'un ancêtre commun très ancien. Le principe de ce type d'analyse moléculaire est décrit dans l'encart suivant.

Commentaire

Les arbres phylogénétiques moléculaires

En partant du principe que le degré de dissemblance entre deux séquences de molécules informationnelles que l'on peut aligner est proportionnel à la distance évolutive qui sépare

les lignées qui les portent, on peut établir des matrices de comparaison et mesurer avec une grande précision leur ressemblance, que l'on interprète comme un lien de parenté. Cette méthode a d'abord été appliquée aux protéines, en particulier les globines chez les Vertébrés. Elle a permis de reconstituer un arbre phylogénétique globalement semblable à celui établi par les méthodes classiques (paléontologie, anatomie et embryologie comparées, etc.), démontrant sa fiabilité. Ces analyses ont ensuite été élargies aux Procaryotes et aux Eucaryotes, grâce à la comparaison des cytochromes c, molécules répandues chez de nombreux êtres vivants.

Plus récemment, le développement des techniques a autorisé la comparaison directe des séquences d'ADN de gènes homologues et donné accès aux «fossiles moléculaires» inclus dans les génomes actuels ; la masse d'informations désormais accessible est considérable. L'analyse des gènes des ARN ribosomiques (en particulier les ARNr 16-18 S, contenus dans la petite sous-unité), qui sont présents chez tous les organismes, a permis de tracer le premier arbre phylogénétique universel. Ces molécules sont d'un grand intérêt, car elles contiennent des régions évolutivement très conservées, à côté de régions variables, ce qui permet de comparer à la fois des espèces très éloignées et des espèces proches. La puissance de ces méthodes est considérable, mais elle reste délicate à manier en raison d'un nombre élevé de biais de calcul qui ne peuvent être détaillés ici.

5.2. Les trois grands groupes d'êtres vivants actuels

Avant la publication des travaux de Woese, le monde vivant était découpé, sur la base du plan d'organisation cellulaire, en deux grands ensembles : les Procaryotes et les Eucaryotes. Toutes les analyses phylogénétiques moléculaires montrent que l'ensemble du vivant doit être désormais partagé en trois groupes fondamentaux, situés à un même niveau phylogénétique, et désignés sous les termes de super-règnes, empires ou domaines ; il s'agit des **Archébactéries** (Archées, ou *Archea*), des **Eubactéries** (Bactéries, ou *Bacteria*) et des **Eucaryotes** (*Eucarya*) qui représentent trois lignées évolutives très anciennes (voir *figure* 16.3). Deux de ces empires sont donc représentés par des Procaryotes, dont la morphologie et le plan d'organisation (grade) sont simples en comparaison de ceux des Eucaryotes. Par de nombreux caractères cependant (biochimiques, physiologiques et génétiques), les Archébactéries se distinguent des Eubactéries ; ces différences, dont certaines ont déjà été décrites dans le chapitre 2, sont résumées dans le tableau 16.1.

Très brièvement, que nous apprend l'analyse de cet arbre phylogénétique en ce qui concerne l'origine des Eucaryotes ? Il démontre d'abord de façon claire que les ancêtres des mitochondries et des chloroplastes sont apparentés aux Eubactéries Gram-négatives, respectivement les Protéobactéries et les Cyanobactéries (représentées ici par *Agrobacterium* et *Anacystis*), dont nous avons déjà parlé. Par ailleurs, on note que :

- les Protistes appartiennent à des groupes qui ont évolué indépendamment des phylums d'organismes multicellulaires, représentés sur la *figure* 16.3 par les genres *Homo*, *Xenopus* et *Zea* (le Maïs). Leur diversité excède de très loin celle notée au sein de ces derniers ;
- les groupes de Protistes sans mitochondries : les Microsporidies, les Diplomonadines et les Trichomonadines (non figurées) qui présentent certains traits moléculaires propres aux Procaryotes, et dont on a longtemps pensé qu'ils n'avaient jamais possédé de tels organites et étaient ainsi très anciens, les ont en fait perdus secondairement. On a en effet découvert dans le noyau de ces micro-organismes des séquences d'ADN typiquement «mitochondriales», témoins fossiles de l'événement d'endosymbiose primaire ancestral, suivi d'une exportation de gènes vers cet organite.

Il s'agit ici d'un exemple d'évolution simplificatrice, probablement liée au mode de vie parasitaire de ces trois types de micro-organismes. Tous les Eucaryotes ont donc, ou ont eu, un jour, des mitochondries. Dans un même ordre d'idées, et en guise de conclusion, il faut sans doute répéter que les Bactéries modernes résultent d'une stratégie évolutive ayant privilégié la rapidité de la division et donc l'efficacité du métabolisme en général. Il en découle une grande simplicité dans tous leurs dispositifs moléculaires : opérons, absence d'introns, polymérases, etc., et leurs structures cellulaires. Des phénomènes semblables (ou convergence) sont observés chez les Eucaryotes, et le cas de la levure de bière (dont les gènes n'ont pas d'introns, par exemple), illustre aussi parfaitement cette notion fondamentale en évolution.

Caractère	Eubactéries	Archébactéries	Eucaryotes
Noyau	absent	absent	présent (double membrane)
Organites	absents (thylakoïdes chez les Cyanobactéries)	absents	présents (très divers)
Cytosquelette	absent	absent	présent
Lipides membranaires	acides gras linéaires	chaînes aliphatiques ramifiées	acides gras linéaires
	liaisons ester (L glycéro-P)	liaisons éther (D glycéro-P)	liaisons ester (L glycéro-P)
	absence de stérols	/	stérols
Paroi cellulaire	peptidoglycane avec acide muramique	divers types ; pas d'acide muramique	cellulose et polysaccharides divers ; protéines
Matériel génétique principal	chromosome circulaire unique	chromosome circulaire unique	plusieurs chromosomes linéaires
ARN polymérase	une seule (4 sous-unités)	une seule (formée d'une dizaine de sous-unités)	trois (formées de 12 à 14 sous-unités)
Épissage des ARN messagers	absent	absent (mais introns dans les ARNr et les ARNt)	présent (introns très répandus)
Taille des ribosomes	70 S	70 S	80 S (ribosomes hyaloplasmiques)
Sensibilité aux antibiotiques :			
• chloramphénicol	+	–	–
• kanamycine	+	–	–
• rifampicine	+	–	–
• anisomycine	–	+	+
ARNt initiateur	porte la formyl-méthionine	porte la méthionine	porte la méthionine
Méthanogenèse	absente	présente chez certaines espèces	absente

Tableau 16.1

Principales caractéristiques différenciant les trois grands groupes d'êtres vivants actuels à l'échelle cellulaire

Le groupe des Archébactéries a été ainsi nommé car son découvreur (C. WOESE) était persuadé qu'il s'agissait du groupe phylogénétiquement le plus ancien de tous et représentant les organismes apparus les premiers sur la Terre ; ils possèdent, en effet, souvent des modes de vie extrêmes correspondant à des conditions physicochimiques censées exister sur la Terre primitive. On notera que ces micro-organismes ont de nombreuses propriétés en commun avec les deux autres groupes.

RÉSUMÉ

L'histoire de la vie commence très rapidement sur la Terre primitive, sous la forme de cellules procaryotiques, environ 500 millions d'années après que les conditions physicochimiques soient devenues propices à son émergence (vers – 3,6 milliards d'années).

Pendant la période prébiotique, se sont accumulées à la surface de la Terre des molécules organiques simples issues, soit de mécanismes chimiques spontanés utilisant les gaz de l'atmosphère primitive et les sources d'énergie disponibles, soit de l'espace interstellaire, sous la forme de météorites riches en matière carbonée.

Diverses expériences montrent que ces molécules peuvent être polymérisées dans des conditions abiotiques et former des macromolécules voisines de celles trouvées dans les cellules modernes. On ignore si les premiers systèmes autoréplicatifs étaient constitués seulement de protéines ou d'ARN ; des données récentes suggèrent que ces derniers ont pu avoir une activité catalytique, et auraient précédé les protéines dans l'histoire de la vie. Le passage du stade protocellulaire au stade cellulaire ancestral a nécessité la mise au point de nombreux dispositifs et mécanismes dont l'origine reste inconnue :

1) une membrane «plasmique» primitive ;
2) le métabolisme, afin de fournir à ces systèmes autoréplicatifs les précurseurs et l'énergie indispensables à leur croissance ;
3) un moyen de codage d'une information génétique et la machinerie de décryptage associée.

De même, l'origine des génomes d'ADN, issus du monde de l'ARN, reste une question fondamentale.

La cellule procaryotique, hétérotrophe et anaérobie, qui est à l'origine des Eucaryotes (vers – 1,4 milliard d'années), n'avait sans doute rien à voir avec les Procaryotes actuels. L'événement clé de cette évolution est la capture de Bactéries capables d'utiliser l'O_2 accumulé dans l'atmosphère, sous l'action de la photosynthèse des Cyanobactéries (théorie de l'origine endosymbiotique des mitochondries).

Plus tard, un second événement fondamental du même type a été réalisé qui est à l'origine de tous les Eucaryotes photosynthétiques actuels.

Des événements d'endosymbiose secondaire, impliquant deux cellules eucaryotiques, dont l'une pourvue de chloroplastes, permettent d'expliquer l'apparition de plusieurs groupes d'Algues.

L'arbre universel du vivant, construit à partir de données moléculaires convergentes, démontre l'existence de trois groupes fondamentaux d'êtres vivants, les Archébactéries, les Eubactéries et les Eucaryotes ; il illustre clairement les relations phylogénétiques existant entre les Procaryotes et les Eucaryotes actuels.

QROC

Les réponses sont disponibles sur Internet à l'adresse www.dunod.com.

1. Donner les dates de :
   a) la formation de la Terre ;
   b) l'apparition des premières cellules ;
   c) l'apparition des cellules eucaryotiques ;
   d) l'apparition des Animaux.
2. Qu'appelle-t-on « stromatolithes », et où les rencontre-t-on à l'heure actuelle sur la Terre ?
3. Décrire l'expérience de S. Miller sur l'origine abiotique des molécules organiques et analyser de façon critique ses résultats.
4. Qu'apportent la radioastronomie et l'analyse de la composition des météorites carbonées par rapport aux questions de l'origine de la vie ?
5. Décrire quelques expériences de polymérisation abiotique des acides aminés et des nucléotides. Préciser les limites de la démarche dite constructiviste.
6. Qu'appelle-t-on coacervats et microsphères ? en quoi ces structures ne répondent-elles pas à la définition complète des systèmes autoréplicatifs ?
7. Qu'appelle-t-on monde de l'ARN ? quels arguments permettent de penser que ces molécules ont précédé les protéines au cours de l'histoire de la vie ?
8. Comment définit-on l'exobiologie, et quels peuvent être ses apports pour la connaissance de l'origine de la vie sur Terre ?
9. Quelles acquisitions fondamentales ont été nécessaires pour passer de la protocellule à la cellule ancestrale ?
10. Décrire la succession probable des métabolismes qui se sont succédés à la surface de la Terre au cours de l'histoire de la vie.
11. Quel événement chimique a entraîné de véritables bouleversements à la surface de la planète et quelles en ont été les conséquences ?
12. En quoi l'ancêtre des cellules eucaryotiques était-il différent des cellules procaryotiques modernes ?
13. Décrire le principe des deux théories classiques qui expliquent l'origine des organites dans les cellules eucaryotiques.
14. Donner les preuves permettant d'affirmer que les mitochondries dérivent de Bactéries aérobies, après leur capture par une cellule-hôte ancestrale.
15. Sous quelle pression de sélection pense-t-on que la symbiose, ayant conduit aux mitochondries, a été stabilisée ?
16. Quelles ont été les conséquences génétiques pour les symbiontes qui sont à l'origine des mitochondries et des plastes ?
17. Quelles différences y a-t-il entre les symbioses primaires et les symbioses secondaires ?
18. Quelles macromolécules communes à tous les êtres vivants ont permis de construire les premiers arbres phylogénétiques dits universels ?
19. Nommer les trois groupes représentant les êtres vivants actuels et décrire l'arbre universel du vivant.
20. Énumérer les caractéristiques cytologiques et physiologiques supposées de la cellule hypothétique représentant l'ancêtre des cellules eucaryotiques.

BIBLIOGRAPHIE

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., *Molecular Biology of the Cell*, 4e éd., Garland Science, 2002.

BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P. & N., LACROIX J.-C., *Biologie et physiologie cellulaires,* tome 1 : membrane plasmique, 1993 ; tome 2 : cellules et virus, 1978 ; tome 3 : division cellulaire, 1981, tome 4 : chromosomes, 1989, Hermann, coll. «Méthodes», Paris.

COOPER G.M., *The Cell*, 1re éd., ASM Press – Sinauer Associates Inc., 1996.

HENNEN G., *Biochimie 1er cycle*, 2e éd., Paris, Dunod, 1998.

KARP G., *Cell and Molecular Biology,* 1re éd., John Wiley and Sons Inc, 1996.

LECLERC H., IZARD D., HUSSON M.O., WATTRE P., JAKUBCZAK E., *Microbiologie générale*. 2e éd. Paris, Doin, 1983.

LEHNINGER A.-L., *Principes de biochimie,* 2e éd., Paris, Flammarion, coll. «Sciences», 1994.

LEWIN B., *Genes VII*, 7e éd., Oxford University Press, 2000.

LODISH H., BERK A., ZIPURSKY S.L., MATSUDAIRA P., BALTIMORE D., DARNELL J.E., *Molecular Cell Biology*, 4e éd., Freeman and Co, 2000.

PERRY J.-J., STALEY J.T., LORY S., *Microbiologie*, 1re éd., Dunod, 2004.

PRESCOTT L.M., HARLEY P.J., KLEIN D.A., *Microbiologie,* 2e éd., Bruxelles, De Boeck, 1995.

ROBERT D., ROLAND J.-C., *Biologie végétale (Organisation cellulaire),* 2e éd., Paris, Doin, 1998.

SOLIGNAC M., PÉRIQUET G., ANXOLABÉHERE D., PETIT C., *Génétique et évolution*, tome 2 : l'espèce, l'évolution moléculaire, Paris, Hermann, 1995.

STANIER R.Y., INGRAHAM J.-L, WHEELIS M.L., PAINTER P.R., *The microbial world*. 5e éd., Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1986.

STRYER L., BERG J.M., TYMOCZKO J.L., *Biochimie*, 5e éd., Paris, Flammarion, 2003.

WATSON J.-D., HOPKINS N.H., ROBERTS J.W., STEITZ J.A., WEINER A.M., *Biologie moléculaire du gène*, 4e éd., Paris, InterÉditions, 1989.

WEIL J-H., *Biochimie générale.* 9e éd., Paris, Dunod, 2001.

INDEX

A

acaryote (état) 452
Acetabularia 210
acétyl-CoA 299, 317, 323
acide
– 3-phosphoglycérique 313
– citrique 299
– hyaluronique 432, 438, 441
– malique 196, 198
– oxalique 196, 324
– oxaloacétique 299
– pyruvique 172, 175, 298
– sialique 114, 464
acides
– aminés 175, 196, 318, 476
– carboxyliques 196
– gras 112, 131, 171, 262, 317, 320
actine 333, 336, 345, 354, 385, 388, 422, 425, 439
actinine 337, 350, 354, 439
actinomycine D 213, 219
acyl-CoA synthétase 317
adaptine 160, 162
adénovirus 454
adénylate cyclase 184, 408
adhérence cellulaire 115, 135, 271, 424, 429, 431, 442
adipocyte 179, 339, 419
ADN 82, 203, 296, 362, 365, 397
– chloroplastique 106
– endommagé 376
– hélicase 369
– informatif 104, 229
– ligase 369
– mitochondrial 105, 297
– polymérase 367-369, 375, 377, 402, 458, 465
– répétitif 104
– topoisomérase 369
– viral 462, 463
adrénaline 184, 407, 408
adressage
– des protéines 69, 193, 246, 275, 278, 282, 283, 449
æquorine 68
aérobiose 15, 172
agents génotoxiques 376
agrégation cellulaire 417, 429
albumine 419
allostérie 149
amibes 41, 212, 354, 440, 484
amidon 177, 180, 199, 296, 314
aminoacyl-ARNt synthétase 95
amorce (ADN ou ARN) 367
AMP cyclique 184, 408, 428
amphiphilie 9, 112, 115-116
amplification
– de l'information 84, 87
– des gènes 237
amyloplastes 180, 293, 419
amylose synthétase 183
anabolisme 4, 170, 176, 181, 319
anaérobiose 15, 172, 321, 482
anaphase 382-384
aneuploïdie 391
anneau contractile 330, 350, 385
anomalies chromosomiques 391
antenne collectrice 308
anthocyanes 76, 146, 195, 197
anti-oncogène 411
antibiotique 43, 98, 449-451
anticorps 54, 124, 141, 164, 214, 237, 250, 331, 385, 426-431, 443
– monoclonaux 340, 430
– polyclonaux 54, 340
antiport 147, 156, 320
apoptose 191, 404, 410
appareil de Golgi 34, 166, 187, 250, 258, 263, 271, 273, 347, 354, 457, 468, 484
appareil mitotique 382, 383
aquaporines 147, 148, 198
arbre universel du vivant 487
arbres de Noël 216, 224, 230
– généalogiques 392
– phylogénétiques 486
Archébactéries (*Archea*) 43, 102, 154, 488
architecture cellulaire 328, 340
ARN 203, 208, 212, 454
– catalytiques 480
– cellulaire 420
– cytoplasmiques 219, 222
– de transfert (ARNt) 80, 84, 85, 219, 222
– messagers (ARNm) 80, 85-88, 219, 222, 225, 240, 253, 256, 281, 420, 449, 459
– négatif, positif 101
– nucléaires 219-222
– nucléaires hétérogènes 220
– nucléolaires 221
– nucléoplasmiques 221
– polymérases 82, 89, 91, 221, 224-226, 238, 449, 465
– précurseurs 222, 228, 231
– primase 369
– réplicase 459, 468
– ribosomiques (ARNr) 80, 83, 219, 222, 486, 487
– transcriptase 459
– viral 452
artefacts 59, 119, 120
articles 38
aster 383
asymétrie membranaire 110, 126, 127, 139, 140, 267, 303
atmosphère primitive 476
ATP 4, 78, 82, 95, 123, 128, 134, 148, 151-156, 172, 175, 181, 184, 199, 227, 253, 267, 278, 280, 285, 291, 295, 298, 303, 305, 310-321, 337, 349, 351, 368, 403, 482
ATP synthétase 123, 154, 294-296, 303, 304, 312, 484
autoassemblage 7, 9, 116, 334, 337, 354, 440, 454, 466
autophagie 187, 190, 191
autophagosome 190
autophosphorylation 407-409
autoradiographie 56, 65, 123, 212, 216, 247, 251, 266, 370, 373, 398
autotrophie 13, 171, 306, 435, 482, 485
axonème 343, 352
axone 135, 330, 346, 348

B

β galactosidase 90
β oxydation 317, 323

bactéries 41, 74
– Gram négatives et positives 42, 437, 485
– méthanogènes 15, 43
– nitrifiantes et dénitrifiantes 15
– pourpres et vertes 42
– sulfureuses 15, 482
– thermophiles 43
bactériophages 101, 452, 453, 457, 461, 463
bactériorhodopsine 125, 154
bande préprophasique 387
bandes
– chromosomiques 215, 389
– G, Q et R 390
barrière de diffusion 131
barrière physique 132, 143
bicouches 9, 117, 125, 127, 144, 145, 147, 150, 153, 157
biogenèse des membranes 116
– des organites 280
biomolécules 3, 6, 478, 481
– primordiales 476
bipartition 284, 362
bis-phosphoglycérate (1-3) 172
boîtes (CAAT, de Pribnow, TATA) 89, 226, 239
bordure en brosse 344
bourgeonnement 158, 165, 275, 286, 455, 460, 464, 468
bras chromosomique 378
brassage
– chromosomique 363
– des exons 230
brins précoce, tardif 368
– d'Okasaki 376

C

cadhérines 425, 430, 443
cadre de lecture 96, 464
calcium 408
canaux ioniques 147, 150, 151, 198, 406, 408
cancérigènes 262
cancers 376, 409, 410, 411, 422
capside 453, 454, 455
capsule 438
cardiolipide 112, 297
carnitine 318
caroténoïdes 307
caryotype 379, 389, 391, 392
cascade de transduction 406
catabolisme 4, 170, 175, 318
catalase 322
ceinture d'adhérence 344, 350, 425, 431
cellules ancestrales 484
– animales et végétales 35-36
– caliciformes à mucus 268, 269
– différenciées 245, 246, 345
– embryonnaires 346, 383, 400, 442
– eucaryotiques 487
– excitables 150
– sécrétrices 286, 348, 422
cellules-souches 209, 245, 345, 365, 386, 389, 404, 422, 442
cellulose 435, 436, 438, 440, 441
centre cellulaire 342
– de tri des protéines 266, 274
– fibrillaire 205, 232
– organisateur de microtubules 335, 340, 383, 386, 389
– réactionnel 308
centrifugation 48, 51, 56, 58, 185, 322, 366, 452
– en gradient de CsCl 81
centrioles 341, 342, 384, 386
centromère 378, 380, 382
centrosome 329, 332-335, 342, 347, 354, 383-386
céramide 113, 261
chaîne
– de biosynthèse 4, 77
– photosynthétique 306
– respiratoire 300, 301
champignons 37
chasse (*chase*) 64, 366
chimiosynthèses 14, 17, 42, 306
chimiotactisme 357
chimiotrophie 14
chitine 440, 441
chloramphénicol 98, 99, 451
Chlorobiontes 486
chlorophylle 309
chloroplastes 37, 134, 157, 260, 261, 283, 291, 295, 306, 311, 319, 324, 484
cholestérol 114, 131, 161, 249, 261
chondroblastes 423, 432
chondrocytes 192, 364, 441
chromatides 215, 217, 218, 363, 378, 382, 384
chromatine 102, 204-211, 238, 373, 378, 381, 382
chromatographie 49, 50, 247, 341
chromatophores 347
chromomères 215, 217, 218
chromoplastes 292
chromosomes 203, 208, 217, 233, 237, 347, 363, 378, 390, 458
– bactériens 370, 372
– eucaryotiques 229, 373-375
– géants 208, 212, 214, 392
Ciliés 39-41, 164, 293, 341, 484
cils 334, 343, 351
cinétosomes 342
clathrine 10, 159-162, 275
clivage de protéines 256, 272
clonage 234, 469
– des gènes 341, 403
code génétique 81, 96, 481, 482
codon 81, 85-87, 96-98, 228, 482
coefficient de diffusion 142
– de perméabilité 143, 145
coenzyme A 317
– Q 301, 302, 321
coenzymes 173, 298-300, 480
coiffe 226, 227
colchicine 335, 346, 390
colinéarité gène-protéine 78, 79
collagène 226, 433, 438-441
coloration 30, 31, 32, 291, 300
– négative 28, 32, 59, 295, 296, 329, 358, 454
– vitale 28, 291, 300
communication 419, 427, 444
– intercellulaire 396, 417, 443
compartiment endosomal 153, 159, 162, 467
compartimentation 4, 34, 41, 110, 132, 139, 203, 213, 245, 268, 481
complémentation fonctionnelle 69, 403
complexes
– anticorps/antigène 55
– de préinitiation 221, 238
– d'épissage 10, 227
– de transcription 216, 218, 230
– des pores nucléaires 204, 247, 279
composant
– fibrillaire dense 205
– granulaire 206
connexon 427
contraction des sarcomères 350
contrôle de l'expression des gènes 233, 236, 238
conversion de l'énergie 291
coopération métabolique 315
corps intermédiaire 385
corps résiduels 188
corpuscules basaux 342
cotransport 147
coupe 26, 30, 32, 65, 329
couplage énergétique 181
couples Red./Ox. 301
croissance 245, 396, 444, 479, 481
– cellulaire 176, 411, 438
crossing-over 364
cryodécapage 119, 147, 351, 426
cryofracture 28, 32, 119, 120

culot (sédiment) 57
culture de cellules 61, 62, 405, 409, 452
cultures
– non synchrones 399
– synchrones 372, 397
Cyanobactéries 42, 102, 358, 475, 482-488
cycle amphibolique 319
– cellulaire 69, 283, 374, 396-401, 404, 409, 450, 468
– centrosomique 384, 397
– de Calvin-Benson 174, 307, 312
– de Hatch et Slack 316
– de Krebs 172, 298, 317, 324
– de l'urée 319, 419
– glyoxylique 324
– lysogène et lytique 463
– viral 458, 459, 461
cyclines 285, 402, 403
– G1 et mitotiques 403, 411
cycloheximide 99
cyclose 351
cytochalasine 164, 348, 354
cytochimie 31, 53, 66, 266
cytochrome oxydase 302
cytochromes 261, 300, 302
cytodiérèse 378, 385, 388
cytoenzymologie 66, 185, 195, 266, 300
cytokines 405, 444
cytométrie en flux continu 70, 398
cytosol 35
cytosquelette 35, 40, 130, 157, 164, 267, 274, 328, 340, 383, 387, 425, 439, 442, 444, 487

D

décapsidation 460
dédifférenciation 199, 365, 423
démarche constructiviste 474, 478
densité de flottaison 53, 365
déplacements des cellules 439
desmine 339, 350
desmosomes 333, 345, 425
détergents 122, 253, 301
détermination 234, 239, 422
– cellulaire 421
détoxification 134, 154, 262, 323
développement embryonnaire 241, 350, 409, 410, 416, 421, 428, 431, 439
dictyosomes 158, 263, 265
différenciation 35, 237, 294, 364, 397, 404, 416-420, 423, 441
– cellulaire 37, 209, 236, 238, 419
– terminale 234, 422
diffusion 141, 148, 351
– latérale 129, 130, 259
– simple et facilitée 149
– transversale 127, 128
digestion
– extracellulaire 192
– intracellulaire 187
dimérisation des récepteurs 407
diphosphatidyl-glycérol 297
diplosome 342
disques Z 346
dissociation de tissus 429
division 5, 35, 284, 347, 363, 377, 386, 388, 389, 396, 404, 405, 442, 444
dogme fondamental 78, 80
dolichol 256
domaines hydrophobes 124, 166
dynéine 343, 347, 349, 352, 383

E

échanges d'eau 146, 147
échangeurs ioniques 156, 198
ectoplasme 355
édifices supramoléculaires 3, 8, 9, 59, 246, 459
élastine 434, 441
électrophorèse 49-51, 110, 220, 247, 419, 452
éléments amplificateurs 226, 238
embryogenèse somatique 423
encapsidation 463
endocytose 35, 133, 158-163, 183, 188, 267, 286, 353, 465, 470, 484
endolysine 463
endoplasme 355
endoréplication 215, 386
endosomes 35, 162, 164, 188, 467
endosymbiose 486
endosymbiose mitochondriale et chloroplastique 35, 485
énergie 4, 13-15, 35, 134, 148-155, 172, 177-181, 246, 280, 298, 303, 306, 322, 452, 476, 480
entérocytes 140, 155, 164, 274, 426
énucléation 210, 213
enveloppe nucléaire 204, 219, 381, 382, 389
enzymes 4
– de ménage 234
– de réparation de l'ADN 411
– digestives 250
épissage 227
– alternatif 229, 240
épithélium 36, 155, 295, 428, 442
ergastoplasme 248
érythromycine 98, 451
érythropoïétine 405
espaceur non transcrit 230
étiquetage moléculaire 277
Eubactéries (*Bactéria*) 41, 42, 488
Eucaryotes (*Eucarya*) 12, 23, 33, 488
euchromatine 205
évolution 1, 3, 5, 8, 102, 376, 392, 416, 474, 477, 479, 481, 487
excision-épissage 227
exobiologie 481
exocytose 35, 158, 164, 199, 250, 258, 266, 273, 275, 286, 348, 353, 452, 457, 464, 468
exon 88, 89, 225, 230
expression
– des gènes 74, 78, 90, 203, 235, 236, 239, 362, 378, 421, 444, 466, 468
– différentielle du génome 234, 345

F

facteur d'entrée dans la phase S 401
– d'entrée en mitose 402
– de croissance 61, 397, 404-406, 409, 411, 444
– de transcription 89, 221, 236, 238, 402, 405, 409, 411
facteurs mitogènes 409
FAD/$FADH_2$ 261, 299, 300, 303, 321, 323, 480
familles multigéniques 104
fermentations 172, 298, 481, 485
ferrédoxine 281, 309
ferritine 55, 162, 180
fibre de rétraction 354
– nucléosomique 208
fibres
– musculaires 330, 349
– rayonnantes 343
– toniques 333
fibroblastes 162, 240, 267, 292, 329, 339, 346, 352, 419, 432, 439
fibronectine 240, 434, 439-443
filament axial 357
filaments intermédiaires 10, 130, 328, 330, 333, 338, 339
films noirs 144
filopodes 352
fimbrine 337, 345
fixation cytologique 30, 32
flagelles 334, 343, 351, 418, 484
– bactériens 10, 355, 356

Flagellés 41
flavoprotéines 322-323
flip-flop 127, 260
fluidité membranaire 110, 126, 129, 132, 140, 141, 161, 426
fluorescence 28, 56, 67, 69, 129, 141, 308
fluorochrome 55, 70, 331, 429
flux membranaire 133, 262, 286, 291, 354
force proton-motrice 304
fossiles moléculaires 474, 488
fourche de réplication 368, 369
foyer de nucléation 332
fractionnement
– cellulaire 47, 56, 110, 185, 247, 251, 266, 296, 322, 430
– chimique 48
fragments d'Okasaki 368, 376
frottis 28
fuseau de division 347, 382, 384
fusions cellulaires 401

G

galactocérébroside 114, 419
gangliosides 114, 419
gelsoline 338, 354
génération spontanée 23
gènes 73, 76, 82, 86, 91, 100, 203
– de structure 91
– eucaryotiques 88, 225, 468
– morcelés 88
– plasmidiques 451
– procaryotiques 87, 102
– régulateurs 91
– répétés, redondants 104, 230
– ribosomiques 230, 485
– uniques 104
génie génétique 240, 247, 449, 469, 485
génome mitochondrial 70, 284, 294, 302
génomes 246, 482
– ancestraux 480
– des Procaryotes 84, 101
– eucaryotiques 75, 102, 103, 105
– extranucléaires 102
– plasmidiques 102
– segmentés 455, 464
– viraux 100, 458, 460, 462, 467
GFP 68, 247
globine 220, 225
glucagon 184, 271, 272
glucides 172
gluconéogenèse 175, 313, 319
glucose 172, 175, 298, 305
glycéraldéhyde 3-phosphate 313
glycérol 112, 175
glycocalyx 139, 140, 165
glycogène 177, 182, 184, 408, 419
glycolipides 112, 114, 140, 194, 262, 271, 297, 317, 320
glycolyse 172, 298, 299
glycophorine 125, 270
glycoprotéines 116, 140, 250, 267, 270-272, 425, 430, 431, 435, 438, 464, 468, 470
glycosaminoglycanes 193, 270, 432, 438, 441
glycosidases 256
glycosylation 256, 267-271, 277
glyoxysomes 324
gradient 52, 149, 155
– de densité 52, 63, 322, 365
– de protons 134, 154, 156, 298, 303, 304, 310, 357, 484
– électrochimique 148, 150, 304, 320
grana 295
granules de pigment 348
granules de sécrétion 251, 267
greffe nucléaire 210
GTP 97, 175, 299, 335, 408

H

Halobactéries 43, 130
hélice amphiphile 125
hémagglutinine 455, 464
hématies 111, 124, 129, 140, 151, 155, 189, 210, 344, 419, 422
hémicelluloses 435, 436
hémidesmosomes 345, 425, 439
hémoglobine 9, 210, 228, 419
hémolyse 111, 146, 152
hépatocytes 36, 178, 191, 240, 249, 262, 264, 267, 292, 323, 386, 419
hétérocaryons 62, 141, 142
hétérochromatine 205, 209, 375
hétérodimères αβ 334, 340
hétérophagie 187, 190
hétérotrophie 13, 171, 435, 482
histamine 165, 444
histolyse 191, 215
histones 206, 238, 380, 404
homéostasie 5, 404, 423
homogénéisation 56, 185
hormones 135, 161, 268, 404, 407, 441, 444
– polypeptidiques 250, 267
– stéroïdes 235
hyaloplasme 35, 132, 172, 176, 195, 246, 278, 285, 320, 328, 340
hybridation *in situ* 55, 56, 392
hybridomes 341
hydrolases lysosomales 186, 189, 192, 196, 275
hypercholestérolémie 163
hyphes 38

I

immunocytochimie 53, 54, 55, 247, 341, 350, 351
immunofluorescence 55, 263, 331, 342, 346
immunoglobulines 54, 161
imprégnation 31, 265
inclusion (cytologie) 30, 32
inducteur, induction 90, 91
induction embryonnaire 421
infection virale 461, 467
infections opportunistes 466
information génétique 73, 80, 85, 203, 213, 280, 291, 362, 416, 421, 450, 458, 459, 465, 479
inhibiteur compétitif 149
inhibition de contact 405
insertion cotraductionnelle 100, 133, 199, 253-255
instabilité dynamique 335
insuline 184, 271, 272, 407
intégrase 463, 465
intégration du métabolisme 174, 317
intégrines 434, 438-440
interdigitation membranaire 427
interféron 405
interleukines 405
interphase 209, 377, 397
intron 88, 104, 225-230, 480, 488
inuline 196
ionophores 157
isoformes 241
isotopes 63, 65, 365

J

jonctions
– communicantes 247, 421, 427
– d'ancrage 421, 425
– étanches 155, 425
– exon-intron 227, 228
– intercellulaires 36, 131, 135, 274, 330, 345, 417, 424

K

kératine 331, 339, 345, 419, 422
kinase 184, 408
kinésine 347, 349, 384
kinétochore 380, 382, 384

L

lactico-déshydrogénase 420
lame basale 432, 434, 442, 443
lamelle moyenne 388, 435
lamellipodes 333, 352
lamina (lamines) 204, 339, 346, 381, 404
laminine 434, 439, 442, 443
LDL 161, 162, 163
lécithine 112
lectines 54, 390
leucoplastes 181, 292, 320
levure de bière 278, 322, 364, 380, 396, 402, 449
lignées cellulaires 62
lignine 436, 438, 441
lipides 174, 179, 183, 249
– de réserve 178
– membranaires 259, 262, 266
liposomes 117, 144, 479, 481
lymphocytes 140, 188, 237, 340, 404, 443, 457, 465, 466
lymphokines 466
lyse cellulaire 460, 463
lysogénie 463
lysosomes 35, 153, 162, 184-188, 193, 259, 266, 269, 275, 484

M

macromolécules 3, 4, 5, 6, 170
– informatives 7, 479
macrophages 188, 189, 443, 466
maladies de surcharge 193
– génétiques 76, 163
mannose 6-phosphate 276
manteau cellulaire 140, 257, 267
MAP kinase 407, 409
marquage radioactif *in vivo* 63
marqueurs 29, 185
– enzymatiques 59, 297, 322
matériel génétique 35, 73, 203, 212, 217, 234, 363, 376, 386, 396, 400, 448, 451-462, 468, 483
matrice extracellulaire 10, 36, 115, 130, 133, 135, 140, 165, 248, 250, 270, 345, 354, 405, 416, 419, 432, 438-443
– mitochondriale 281, 282, 293, 312, 317, 318
maturation 85, 86, 222, 228
– des ARN 226, 231, 240
– des protéines 259, 263, 266
mécanismes de réparation 377
– génétiques fondamentaux 481
méiose 217, 235, 363, 391, 402
membranes 110, 247, 438, 481
– biogéniques 128, 260
– biologiques 9, 457, 478
– plasmiques 116, 139, 142, 170, 246, 259, 267, 354, 357, 372, 425, 430, 460, 470
– pourpres 130, 154
méristèmes 365, 389
mérotomie 209
messager intracellulaire 428
messager secondaire 184, 408
métabolisme 1, 4, 13, 42, 172, 174, 294, 318, 322, 452, 481
– CAM 317
métabolites 171, 196, 320, 451
métaphase 378, 382, 384
micelles 117
microfilaments 10, 130, 328, 330, 333, 336, 337, 425
microscope 23-26, 29
– à balayage 33, 380
– à effet tunnel 59, 61
– confocal 332
– électronique 18, 20, 26, 119
– photonique 18, 25, 28, 331
microsomes 59, 126, 252, 266
microtome 30
microtubules 10, 328, 332-335, 346, 353, 383-388, 440
microvillosités 118, 140, 273, 330, 344, 345, 426
migration cellulaire 431, 434, 442
milieux de broyage 57
minimyosine 338, 345, 351, 354
mitochondries 34, 134, 157, 173, 177, 183, 280, 283, 291, 298, 317-320, 347, 350, 484
mitose 234, 340, 347, 363, 378, 381, 386-389, 399, 421
molécules informationnelles 481, 487
– prébiotiques 476
monde de l'ARN 480
monocouches 111, 117
mort cellulaire programmée 191, 409, 410
mosaïque fluide 120, 121, 141
moteur rotatif 356, 357
moteurs moléculaires 348, 349, 351, 352, 384
motilité cellulaire 159, 328, 351
mouvements 352
– cellulaires 30, 340, 419
– intracellulaires 347
mucoprotéines 140, 268, 271
multiplication végétative 365
mutants auxotrophes 69
– conditionnels 69, 398, 402
– de régulation 91
mutations 377
Mycoplasmes 43, 102
myélome 341, 422
myoblastes 346, 365
myofibrilles 349
myosine 338, 350, 385, 422

N

NAD⁺/NADH 173, 261, 299-303, 321, 480
NADH déshydrogénase 302
NADP⁺/NADPH 173, 199, 262, 306, 309, 316, 321
navette mitochondriale 321
néoglucogenèse 324, 419
neurofilaments 330, 339, 345
neurotransmetteurs 407, 444
neurotubules 344
neutrophiles 186, 188
nexine 343, 352
noyau 34, 203, 209, 278, 399, 483
nucléocapside 453-457, 460, 464
nucléofilament 207, 208
nucléoïdes 101, 105, 294
nucléole 204-209, 230, 232, 237, 381, 382
nucléomorphe 486
nucléoplasme 204
nucléoplasmine 279
nucléosomes 207, 224, 238, 373
nucléotides 173, 365, 372, 374
nutriments 170, 172, 428, 441

O

œil de réplication 368, 369, 374
oléoplastes 181, 293, 320
ombrage métallique 32, 59, 119, 207, 373, 435, 450
oncogènes 411, 461, 465, 468
oncogenèse 410
opérateur 89
opéron 87-89, 91-93, 100
or colloïdal 55, 162
organisateur nucléolaire 211, 230, 231, 379, 381
organites 3, 25, 34, 41, 57, 59, 170, 245-247, 280, 328, 347, 386, 416, 419, 482, 483
– semi-autonomes 211, 213, 246, 278, 483
organogenèse *in vitro* 423
origine de la vie 474
origine de réplication 368, 374, 400, 450
oscillateur biologique 403
osmose 143, 146

osmotrophie 14, 171
ostéoblastes 192, 423, 432, 441
ovalbumine 220, 225, 420
ovomoruline 425, 431
oxydoréduction 154, 172, 174, 299, 301, 305, 308, 311, 321
oxygène 298, 305, 323
ozone 485

P

pancréas exocrine 165, 250
paroi 388, 424, 436, 440
– bactérienne 432, 437
– cellulosopectique 37, 181, 428, 432, 434, 440, 460
– primaire 435
– secondaire 435, 436, 440
particule de reconnaissance du signal (PRS) 254
– virale 10, 166, 452, 459, 461, 463
particules F0-F1 304
– d'épissage 449
– RNP nucléaires 225
pectines 435, 436
pénicilline 450, 451
peptidase du signal 256
peptide-signal 199
peptidoglycane 42, 437, 450, 461
peptidyl-transférase 97
période prébiotique 475
périplasme 42, 246
perméabilité membranaire 110, 139, 141, 143, 145
perméases 149, 150
peroxydases 322, 323
peroxysomes 35, 278, 291, 322-324, 485
phagocytose 159, 164, 188, 484
phagosome 188, 159, 164
phagotrophe 14, 171, 487
phalloïdine 348, 354, 385
phase d'éclipse 462
– G0, G1, G2 399, 400
– lumineuse 306
– obscure 307
– ouverte de lecture 85
phases
– du cycle cellulaire 397, 400
– haploïde et diploïde 35
phosphatases 185, 265, 277
phosphoarginine (-créatine) 182
phosphoénolpyruvate 172, 177, 315
phospholipases 141, 408
phospholipides 112, 127, 140, 161, 261, 317, 320, 452
phosphorylase kinase 184, 408
phosphorylation 184
– au niveau du substrat 172
– de protéines 404-407
– oxydative 172, 298, 304
photolyse de l'eau 306, 310
photophosphorylation 311, 312
photorespiration 323
photosynthèse 14, 134, 154, 182, 198, 306, 314, 319, 419, 482
– non oxygénique 307, 482
photosystèmes 308, 309, 311, 482
phototrophie 14
phragmoplaste 348, 388, 389
phycobilines 307
phycobilisomes 309
phylogénies moléculaires 485
pigments photosynthétiques 297, 307
pili 10, 449
pinocytose 159
plantes en C3, en C4 198, 314
plaque cellulaire 388
– d'adhérence 354, 439
– métaphasique 382
plasme germinal 386
plasmides 102, 403, 420, 448, 469
plasmodes 38
plasmodesmes 247, 388, 418, 425, 427, 428
plasmolyse 146
plastes 34, 280, 292, 295, 485
plastocyanine 282, 310
plastoquinone 310
plateau strié 344
pluricellulaires 396, 404, 416, 417, 440, 475
points de contact focaux 333, 338, 353, 439, 440
polarité cellulaire 245
pôle hydrophile(phobe) 116
polyadénylation 226, 227
polymères 6
– biologiques primordiaux 478
polymérisation *in vitro* 335, 336
polyphylétisme 389
polyploïdie 391
polyprotéines 272
polysaccharides 177, 265, 272, 435, 438, 452
polysomes 81, 99, 100, 248
polyténie 215
pompe H+ ATP dépendante 162
pompe Na+/K+ 124, 151, 152
pompes à protons 153, 154, 187, 198, 303, 482
pore nucléaire 204, 209, 280, 382
porine 42, 247, 297
potentiel d'action 135
– de membrane 152
pouvoir réducteur 299, 305, 309
précurseurs 4, 63, 64, 211, 216, 273, 319, 370, 399, 468
préribosomes 231, 232
prions 448, 469
procaryotes 12, 23, 33, 41, 86
profil d'hydrophobicité 125, 147
progénote 479, 481
prolifération 234, 245, 364, 396, 400, 404, 409, 418, 442, 465
prométaphase 382
promoteur 83, 87, 89, 226, 229
prophage 463
prophase 363, 381
proplastes 284, 292
protéase 253, 470
protéasomes 154, 285
protéine
– G 135, 184, 407, 408
– P53, 410, 411
protéine-chaperon 98, 256, 281, 284, 285
protéine-kinase 402, 405, 408, 449
protéines associées aux microfilaments et aux microtubules 336, 337
– d'adhérence 424, 429
– d'échange de phospholipides 261
– de coiffage 338
– de fusion 254
– de réserve 250
– de réticulation 337
– de stabilisation 337, 370
– extrinsèques 121, 457
– fibreuses 432, 433, 441
– intrinsèques 121, 256, 260
– membranaires 115, 121, 139, 147, 257, 273, 275
– non-histones 206, 380
– porteuses 147, 187, 299
– régulatrices 237
– sécrétées 248, 250, 262, 275
– tissu-spécifiques 234
– ubiquistes 419
Protéobactéries 485, 486, 488
protéoglycanes 116, 140, 165, 250, 267, 270, 432, 438, 441
protéoliposomes 118, 120, 122
protéoplastes 181, 293
Protistes 38, 164, 187, 214, 264, 322, 324, 329, 341, 351, 362, 364, 389, 397, 416, 440, 453, 466, 480, 486, 488
proto-oncogènes 411, 465
protocellules 479
protofilaments 329, 334, 339, 355, 356

protoplasme 24
provirus 463, 465
pseudopodes 354
puffs 216, 235, 236
puits recouverts 159, 467
pulse 64, 81, 211, 313, 398, 399
pulse-chase 64, 212, 221, 247, 251, 266, 268
puromycine 99
pyruvate décarboxylase 299

Q

queue de poly A 227

R

radioactivité 63, 65
rapport nucléocytoplasmique 204
réactifs de Hill 306
réaction APS 54
– de Feulgen 54, 206
– inflammatoire 165
réactions anaplérotiques 319
récepteur 135, 184
– de la PRS 254
– de la séquence-signal 255
– des LDL 161, 162
récepteurs 115, 162, 165, 267, 357, 405
– au mannose 6-P 277
– catalytiques 407, 408
– couplés aux protéines G 406
– cytoplasmiques 406
– membranaires 133, 134, 154, 161, 247, 282, 406, 407, 409, 411, 421, 439, 444, 467
– non catalytiques 407
récepteurs-canaux 407
reconnaissance 115, 271
réduction des nitrates et des sulfates 319
régénération 234, 365, 423
régulation 90, 91, 135
renouvellement 4, 181, 222, 245, 246
– cellulaire 191, 404, 410
réparation
– de l'ADN 370, 376
– des tissus 365
réplication 217, 362-373, 384, 396, 449, 453, 462, 466
réplicon 374, 375, 450
réplique 28, 119, 294
répresseur 91, 92, 240, 468
reproduction 1, 5
– asexuée 365
– cellulaire 362
– sexuée 35, 362
reptation 352
réseau transgolgien 265
réserves 170, 176, 180-183, 195, 294, 419, 436
résistance plasmidique 450
respiration 14, 172, 319, 324, 482
– cellulaire 134, 298, 482, 485
rétention active 259
réticulum 347
– endoplasmique 34, 128, 153, 154, 248, 262, 265, 286, 386, 388, 457, 464, 470, 483
– endoplasmique rugueux (RR) 166, 248, 256, 484
– endoplasmique lisse (RL) 249, 259, 260, 262
– sarcoplasmique 153, 250, 350
rétrovirus 411, 457, 459, 465
ribosomes 10, 81, 83, 93-97, 166, 230, 237, 248, 252, 253, 264, 285, 386, 483
ribozyme 97, 480
ribulose 1,5-bisphosphate 313
routage 100, 245, 278, 279, 286, 467
RUBISCO 281, 284, 313-316

S

saccharose 182, 196, 198
sarcomères 330, 349
schéma dit en Z 310
scissiparité 41, 362
SDS 122, 123
sécrétion 158, 165, 266, 273
– des protéines 70
segmentation 364, 386, 400, 421
sélection 357, 364, 481, 485
séquence consensus 96
séquences
– codantes (non codantes) 86, 87, 88
– ARS 375
– topogéniques 257
séquences-signal 253, 275, 280, 281, 468, 485
signalisation
– cellulaire 126, 396, 405, 406
– hormonale 416, 444
signaux de transcription 89
sillon de division 385
siphons 38
sites de contact 281
sonde nucléique ou protéique 53, 219, 234, 420
sondes métaboliques 29, 67
souches auxotrophe et prototrophe 77, 90
– sauvage et mutante 77
soupe primitive 477
spectre d'absorption et d'action 307
sphingolipides 112, 114, 261
sphingomyéline 113, 261
sphingosine 112
spicules 352, 457, 468
stabilité des ARNm 240
stéréocils 330, 344
stérols 112
Streptomycètes 102
streptomycine 98, 451
stroma 281, 295, 311, 312
stromatolithes 475
structure cœnocytique 38
– trilaminaire 118, 139
substances antimitotiques 336
– morphogènes 210
substrat fluorogénique 67
succinate 324
succinate-déshydrogénase 300
surenroulement 370
surfaces (enzymatiques) actives 133
– minérales catalytiques 478, 481
surnageant 57
symbioses 484
symport 147, 155, 156, 320
synapses 428, 444
syncytiums 206
synthèse des acides aminés 175
– des ADN (voir réplication)
– des ARN (voir transcription)
– de l'amidon 183
– des lipides 182, 260
– des protéines (voir traduction)
– des sucres 312
systèmes acellulaires 70
– autoréplicatifs 479, 481
– de correction 376
– de synthèse protéique *in vitro* 79, 213, 253
– inductible et répressible 91

T

tamisage moléculaire 49-50
tapis roulant 335, 337, 384
taxol 336
techniques
– analytiques 48, 49, 52, 61
– de biologie cellulaire 18
télomère (télomérase) 375, 378, 409, 410
télophase 382, 388

terminateurs 83
Terre primitive 474, 476
test APS 177, 178, 273
– de complémentation 77
– de Gram 437
– trophique 77
tétracycline 98, 451
théorie
– chimiosmotique 304, 311
– chromosomique 69, 76
– endogène 483
– endosymbiotique 116, 484
théories cellulaire et tissulaire 17, 23, 24, 33, 170
thylakoïdes 42, 282, 295, 320
thyréocytes 190
thyroglobuline 161, 190, 226, 269
tissus conjonctifs 432, 443
tonofilaments 330, 345
tonoplaste 194, 198, 199
totipotence 234, 365, 423
traduction 73, 80, 94, 95, 96, 99, 203, 219, 246, 437, 450, 462
trafic membranaire 286
– intracellulaire des protéines 250, 347
transaminations 318, 175
transcriptase inverse 80, 457, 459, 464, 480
transcription 73, 80, 203, 211, 213, 218, 223-226, 238, 450, 453, 462, 466, 468
transcrit primaire 89, 222, 226, 227, 231
transcytose 163, 164, 183
transduction du signal 134, 184, 409, 421, 439, 441
transferrine 161, 163
transformation (transfection) 74, 469
transit intracellulaire 378
transmission chimique 444
transplantations nucléaires 234
transport
– actif primaire 148, 151
– actif secondaire 155, 198, 320
– axonal 347, 348
– co(post) traductionnel 247
– des électrons 298, 300, 301, 310
– des ions 444
– des macromolécules 158, 467
– passif 148
– rétrograde 276
transporteur ADP/ATP 320
transporteurs 115, 133, 274, 484
– ABC 154
– des mitochondries 175
– GLUT 149
– membranaires 171, 320, 461
– vacuolaires 198
tremblante du mouton 470
triage cellulaire 71, 429
trieur de cellules 398
triglycérides 175, 178, 419
trioses-phosphates 172, 182, 314
triplets 81, 87, 482
– de nucléotides 86
– parallèles de microtubules 341
triton X-100 122, 123
tropocollagène 433
tropomyosine 338, 350
troponines 350
tryptophane synthétase 79
tubulines α, β et γ 334, 335, 340
tunnels protéiques 282
turgescence 146, 156, 195
turn-over (voir renouvellement) 4, 222
type trophique 13

U

ubiquitine 285
ultracentrifugation 51, 365, 452
unicellulaires 364, 396, 404, 416
uniport 147
unité de transcription 83, 86, 99, 100, 224, 230

V

vacuole 35, 37, 181, 184, 194, 195, 259, 278, 324, 351
– autophagique 190
– de phagocytose 188
valeur c (ADN) 103, 104
vecteurs 469
vésicule acrosomale 193
vésicules 123, 247
– de transition 166, 249, 258, 264
– recouvertes 159
villine 337, 345, 354
vimentine 339
vinblastine 336
vinculine 338, 350, 439
virion 258, 452, 463, 469
viroïde 448, 449
virus 10, 12, 59, 74, 100, 110, 142, 159, 166, 429, 448, 451
– de la forêt de Semliki 457, 467
– à enveloppe 258, 275, 455, 468
– de la grippe 101, 455, 456, 464
– de la mosaïque du tabac 101, 452, 453
– de la vaccine 101, 456
– du SIDA (VIH) 457, 465
– ΦX 174 101
– oncogènes 465
vitalisme 1, 19, 23
vitamines 171
voies de l'AMPc 408
– de sécrétion 165
– des hexoses-monophosphates 172, 173, 307
– des MAP kinases 409
– des phosphoinositides 408
– métaboliques 170, 481
Volvocales 417, 418

Z

zone fibrillaire 233
– granulaire 233
zymogramme 50

SCIENCES SUP

Jean-Claude Callen
Avec la collaboration de Roland Perasso

2e édition

BIOLOGIE CELLULAIRE
Des molécules aux organismes

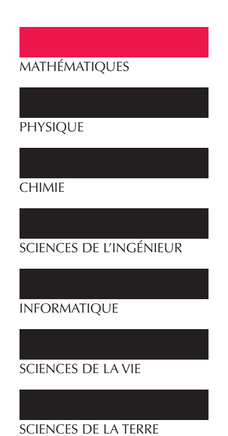


Ce manuel s'adresse aux étudiants des premières années d'enseignement supérieur (Licence SV, PCEM, PCEP, Classes préparatoires…). Il décrit la vie cellulaire par une approche à la fois **descriptive** et **fonctionnelle**, en s'appuyant sur un large support expérimental.

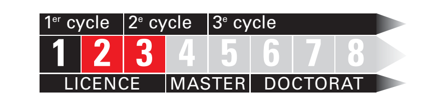
Après avoir rappelé les données indispensables de Biochimie et de Biologie Moléculaire, puis présenté les techniques de base en Biologie Cellulaire, les structures des cellules procaryotiques et eucaryotiques sont décrites et mises en relation avec leurs fonctions : membranes et échanges avec le milieu extérieur, noyau et expression des gènes, systèmes membranaires internes et transit des protéines, cytosquelette, architecture et motilité cellulaires… La cellule est ensuite resituée dans le contexte de l'organisme pour introduire les notions de contrôle de la prolifération, de différenciation et de diversité cellulaire.

En fin d'ouvrage, après avoir analysé la situation des virus, des plasmides, etc., en marge du monde vivant, les théories les plus récentes sur l'origine de la vie et l'évolution des cellules sont exposées.

De très nombreux encarts historiques, techniques et biomédicaux, des pages « Perspective biomédicale », enrichis dans cette 2e édition, illustrent le cours et font la relation entre les concepts et la réalité du laboratoire ou l'observation de la vie courante. En fin de chapitre, un résumé permet d'aller à l'essentiel et des questions à réponses ouvertes et courtes (QROC), dont les corrigés sont disponibles sur le site www.dunod.com, aident l'étudiant à s'auto-évaluer.







DUNOD

ISBN 2 10 049236 5

www.dunod.com